

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年5月17日 (17.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/34785 A1

(51) 国際特許分類: C12N 9/48, 15/57, 5/10, C07K 16/40,  
C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/07917

(22) 国際出願日: 2000年11月10日 (10.11.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平 11/321740  
1999年11月11日 (11.11.1999) JP  
特願平 2000-144020  
2000年5月16日 (16.05.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo (JP). 財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所 (KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番3 Chiba (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山地 昇 (YAMAJI, Noboru) [JP/JP]. 西村耕一 (NISHIMURA, Kouichi) [JP/JP]. 阿部邦威 (ABE, Kunitake) [JP/JP];

〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 小原 収 (OHARA, Osamu) [JP/JP]; 〒292-0801 千葉県木更津市請西二丁目20番25号 Chiba (JP). 長瀬隆弘 (NAGASE, Takahiro) [JP/JP]; 〒292-0042 千葉県木更津市清見台南二丁目6番5号 Chiba (JP). 野村信夫 (NOMURA, Nobuo) [JP/JP]; 〒292-0814 千葉県木更津市八幡台五丁目2番11号 Chiba (JP).

(74) 代理人: 長井省三, 外 (NAGAI, Shozo et al.); 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW). ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: NOVEL METALLOPROTEASE HAVING AGGREGANASE ACTIVITY

(54) 発明の名称: アグリカナーゼ活性を有する新規な金属プロテアーゼ

(57) Abstract: A novel metalloprotease having an aggrecanase activity which causes joint diseases; a gene encoding this metalloprotease; a promoter of the above metalloprotease; a method of screening a drug with the use of the above metalloprotease; and compositions for inhibiting the degradation of proteoglycans which contain as the active ingredient a substance inhibiting the aggrecanase activity of the above metalloprotease.

(57) 要約:

本発明は関節疾患の原因となる、アグリカナーゼ活性を有する新規金属プロテアーゼ、該金属プロテアーゼをコードする遺伝子、該金属プロテアーゼのプロモーター、該金属プロテアーゼを用いた医薬のスクリーニング法、該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用組成物を提供する。



一 補正書・説明書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## アグリカナーゼ活性を有する新規な金属プロテアーゼ

技術分野

本発明は、関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を有する新規金属プロテアーゼ（以下、「関節疾患アグリカナーゼ」とする）、該「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子、該「関節疾患アグリカナーゼ」の製造方法、該「関節疾患アグリカナーゼ」を用いた、アグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニング方法、該アグリカナーゼ活性を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物、及び該「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子に関するものである。

背景技術

関節疾患は、関節軟骨の損傷・変性を主病変とする疾患である。関節疾患の中で最も患者数の多い疾患は変形性関節症（OA）であるが、現行の治療法においては鎮痛消炎剤やヒアルロン酸製剤が軟骨変性・軟骨下骨破壊に伴う痛みを軽減する目的で対症療法的に用いられているに過ぎず、十分な治療効果を上げているとは言えない状況にある。

関節軟骨は主に II 型コラーゲンと軟骨特異的プロテオグリカンであるアグリカンから構成される組織であり、関節疾患では両者の分解・変性が観察されている。そのため、古くよりこれら細胞外マトリクス成分の分解・変性の制御が関節疾患の治療に繋がると考えられており、分解に関与するプロテアーゼ（コラゲナーゼ、アグリカナーゼ）の同定、そして、それらに対する阻害剤の探索、医薬品としての開発の試みが精力的に行われてきた。

コラゲナーゼ活性を有するプロテアーゼとしてはマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP1、MMP8、MMP13、MMP14 等) が同定され、それぞれの選択的阻害剤が発見されていた。しかしながら、多数のコラゲナーゼ阻害活性を有する MMP 阻害剤を OA、リウマチ性関節炎 (RA) を含む関節疾患治療薬として開発する動きがあったにもかかわらず、これらの疾患を適応症とする MMP 阻害剤は上市されていなかった。このような状況下、関節軟骨のもう一つの主要構成成分であるアグリカンを選択的に分解するアグリカナナーゼが注目された。

アグリカンの Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup> の間を切断する酵素アグリカナナーゼが関節疾患に関与することは、Sandy らや Lohmander らのヒト関節疾患患者の滑液中に検出される主要なアグリカン分解断片がいずれもアグリカナナーゼ切断部位での切断により生じているとした論文で明らかにされていた (Sandy J. D. et al, J Clin. Invest. 89, 1512-1516, 1992; : Lohmander L. S. et al, Arthritis Rheum. 36, 1214-1222, 1993)。一方、関節軟骨の体外移植培養系において、IL-1 誘導により、まずアグリカンの分解が起こり、続いて II 型コラーゲンの分解が亢進することが知られていた (Dingle L. T. et al., Ann. Rheum. Dis. 34, 303-311, 1975; Cawston T. E. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 215, 377-385, 1995; Kozaci L. D. et al., Arthritis Rheum. 40, 164-174, 1997)。マウス関節炎モデルにおいてもアグリカン分解が II 型コラーゲン分解に先行することが報告されていた (van Meurs J. B. et al., Arthritis Rheum., 42, 1128-1139, 1999)。これらのことは、先行するアグリカン分解を阻害することにより II 型コラーゲン分解をも制御しうる可能性を示唆していた。

ところが、金属プロテアーゼであること、細胞外に存在すること、基質認識に糖鎖の関与があること、IL-1、TNF、レチノイン酸で活性が誘導されること等の生化学的性質が分かっていたにも係わらず、関節疾患の原因となるアグリカナナーゼ (「関節疾患アグリカナナーゼ」) の本体は長い間不明のままであった。最近になり、ADAMTS4 (aggrecanase-1: Tortorella M. D. et al., Science., 284,

1664-1666, 1999)、ADAMTS11 (aggrecanase-2: Abbaszade I, et al., J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999) がアグリカナーゼ活性を有するプロテアーゼとして報告された。しかし、これらはヒトOA軟骨で遺伝子発現増強されておらず、また、ヒト膝関節軟骨の体外移植培養系において、関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を誘導する IL-1、TNF、レチノイン酸で遺伝子発現誘導されないことから、「関節疾患アグリカナーゼ」ではないことが判明した。

(Flannery C. R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 260, 318-322, 1999)。上述の通り、「関節疾患アグリカナーゼ」は、未だ取得されていない。

#### 本発明の開示

このような状況下、本発明者らは鋭意検討した結果、「関節疾患アグリカナーゼ」である、アグリカナーゼ活性を有する新規な金属プロテアーゼをコードする遺伝子を単離し、全長 ORF 配列を決定して、組み換え蛋白の生産を可能にすることに成功した。

さらにまた、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた同新規蛋白の製造法を確立した。

また、本発明者らは、該蛋白を用いたスクリーニング法を提供し、当該スクリーニング法を実施し、選択された化合物が「アグリカナーゼ活性」(即ち、該蛋白が有する細胞外基質アグリカンで Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup> の間で選択的に切断する活性)を有意に阻害し、関節疾患の予防及びまたは治療に有用な医薬品となり得ることを見出した。

さらに関節疾患の予防及びまたは治療用医薬品のスクリーニングに有用な、該蛋白のプロモーター遺伝子を単離し、本発明を完成させた。

即ち本発明は、

[1] 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸

配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物、

〔２〕配列番号１で表されるアミノ酸配列の第１番から第５８３番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物、

〔３〕配列番号１で表されるアミノ酸配列、配列番号１で表されるアミノ酸配列の第１番から第６８７番のアミノ酸配列、配列番号１で表されるアミノ酸配列の第１番から第５８３番のアミノ酸配列、配列番号１で表されるアミノ酸配列の第２１３番から第９５０番のアミノ酸配列、配列番号１で表されるアミノ酸配列の第２１３番から第６８７番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号１で表されるアミノ酸配列の第２１３番から第５８３番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物、

〔４〕〔１〕乃至〔３〕の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物のアミノ酸配列をコードする遺伝子、

〔５〕〔４〕に記載の遺伝子を含むベクター、

〔６〕〔５〕に記載のベクターを含む宿主細胞、

〔７〕〔６〕に記載の宿主細胞を用いることを特徴とする、〔１〕乃至〔３〕の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物の製造方法、

〔８〕〔１〕乃至〔３〕の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物に対する抗体、

〔９〕〔１〕乃至〔３〕の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物と被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法、

[10] [1] 乃至 [3] に記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物、

[11] 配列番号 24、25、26、27、28、29、30 若しくは 31 で表される遺伝子、又は該遺伝子の同効物、

に関する。

あるいは本発明は、プロテオグリカン分解抑制用医薬の製造における、[1] 乃至 [3] の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物のアグリカナーゼ活性を阻害する物質の使用に関する。

さらに本発明は、[9] に記載のスクリーニング方法によって得ることができる、当該アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物を阻害する物質の、関節疾患治療における使用に関する。

また、本発明は[11] に記載の遺伝子を用い、当該遺伝子のプロモーター活性を修飾する物質のスクリーニング方法に関する。

#### 発明の実施の形態

以下、本発明で使用される用語につき説明する。本明細書中で使用される「アグリカナーゼ」は、亜鉛配位コンセンサス配列(HE<sub>xx</sub>H)を有し、かつ、関節軟骨に存在するアグリカンを Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup> の間で選択的に切断する活性、即ち「アグリカナーゼ活性」を有する金属プロテアーゼを意味する。また、「アグリカナーゼ」は断りが無い限り、「蛋白」を表す。

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物ならいずれでもよい。

また、好ましくは本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」は、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である。

さらに好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第687番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第687番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である。

ここで、「金属プロテアーゼの同効物」とは、(1)配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼの同効物の場合、第213番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）の部位において、1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、(2)配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼの同効物の場合、第1番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）の部位において、1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、(3)配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第687番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸



配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼの同効物の場合、それぞれの配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1～10 個、より好ましくは 1～5 個）の部位において、1 乃至複数個（好ましくは 1～10 個、より好ましくは 1～5 個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼである。

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」の起源はヒトに限定されない。例えば、ヒト以外の生物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）由来の関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼが含まれる。また、配列番号 1 に記載した「関節疾患アグリカナーゼ」の配列を基にして、遺伝子工学的に人為的に改変した蛋白などが含まれる。

また、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子は、上記の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子、即ち、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子ならいつでもよい。

また、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子ならいつでもよい。

さらに、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 687 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配

列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有するを含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子ならいずれでもよい。

ここで、「金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子」とは、（１）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子の場合、第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）の部位において、1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてかつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼをコードする遺伝子、（２）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子の場合、第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）の部位において、1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてかつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼをコードする遺伝子、（３）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 687 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子の場合、それぞれの配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）の部位におい

て、1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてかつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼをコードする遺伝子、である。

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子として好ましくは、配列番号2記載の塩基配列の1番から1749番、1番から2061番、1番から2850番、637番から1749番、637番から2061番、若しくは637番から2850番を有する遺伝子であり、特に好ましくは配列番号2記載の塩基配列の637番から1749番、637番から2061番、637番から2850番を有する遺伝子である。

本発明のプロモーター遺伝子は、好ましくは、配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31記載の塩基配列を有する遺伝子である。「配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31記載の遺伝子の同効物」とは、配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31記載の塩基配列の中のいずれかの1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）の部位において、1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されていて、かつ、「関節疾患アグリカナーゼ」プロモーター活性を有する遺伝子である。「プロモーター活性」とはDNA鎖の情報をRNA鎖に転写するための開始部位として働く活性を意味する。

GENBANK 及び SwissProt の BLAST (Basic local alignment search tool) (S. F. Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol., 215, 403-410) 検索結果によれば、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」の1つであるMDTS6のアミノ酸配列（配列番号1）（950アミノ酸）、及び、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号2）（2853塩基対）は新規である。前述のADAMTS4、ADAMTS11とアミノ酸配列でのホモロジー検索を行ったところ、配列同一性は50%以下であった。

また、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」には、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼと相溶性の高い、アグリカナーゼ活性を

有する金属プロテアーゼが含まれる。相同性の高い、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼとは、配列番号1で表されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列同一性を示すアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上の配列同一性を示すアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼである。相同性は前述のBLAST検索アルゴリズムを用いて特定することができる。

さらに、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」は、関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニングに使用することができる。該アグリカナーゼ活性を阻害する物質は、プロテオグリカン分解抑制用組成物として有用である。

加えて、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子はプロモーター活性を阻害する物質のスクリーニングに使用することができる点が注目される。本明細書において「プロモーター活性を阻害する物質」とは、プロモーターとしての働きを抑え、「関節疾患アグリカナーゼ」の発現を抑制する物質を意味する。本発明には該アグリカナーゼのプロモーター遺伝子を用いたプロモーター活性を阻害する物質をスクリーニングする方法、及び当該プロモーター活性を阻害する物質の関節疾患予防及びまたは治療のための使用が含まれる。さらには、「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子には複数の変異体、すなわち遺伝子多型が存在する。したがって、該遺伝子多型と関節疾患を含む該アグリカナーゼの関与が想定される疾患との相関解析に用いられ、結果として、遺伝子診断のマーカーとして用いられる可能性がある。

ここで、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」の製造方法、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を検出する方法、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」に反応する抗体の製造方法、本発

明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニング方法、プロモーター活性を検出する方法、プロモーター活性を修飾する物質のスクリーニング方法を以下の1)～7)に記載する。本発明には1)～7)に記載する事項全てを包含する。以下、1)～7)では「関節疾患アグリカナーゼ」を「蛋白」として説明する。

### 1) 蛋白遺伝子の製造方法

#### a) 第1製造法—PCRを用いた方法

本発明の新規蛋白を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から mRNA を抽出する。次いでこの mRNA を鋳型として該新規蛋白 mRNA または一部の mRNA 領域をはさんだ2種類のプライマーを作製する。denature 温度、変性剤添加条件などを改良し、本発明の配列番号1で表されるアミノ酸配列の一部を含む蛋白のそれぞれに適した逆転写酵素—ポリメラーゼ連鎖反応（以下 RT-PCR という）を行うことにより、該新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を得ることができる。もしくは、本発明の新規蛋白を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から調製した mRNA から逆転写酵素により作製した cDNA あるいは市販の該ヒト細胞あるいは組織由来の cDNA を鋳型とした、ポリメラーゼ連鎖反応（以下、PCR という）を行うことにより、該新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を得ることができる。さらに、得られた新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を適当な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該新規蛋白を製造することができる。

まず、本発明の新規蛋白の産生能力を有する細胞あるいは組織から該プロテアーゼをコードするものを包含する mRNA を既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート—グアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。該プロテアーゼの産生能力を有する細胞あるいは組織は、該プロテアーゼをコードする塩基配列を有する

遺伝子あるいはその一部を用いたノーザンブロッティング法、該プロテアーゼに特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティング法などにより特定することができる。

mRNA の精製は常法に従えばよく、例えば mRNA をオリゴ (d T) セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等により mRNA をさらに分画することもできる。また、mRNA を抽出せずとも、市販されている抽出精製済みの mRNA を用いても良い。

次に、精製された mRNA をランダムプライマー、オリゴ d T プライマーまたはカスタム合成したプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い第 1 鎖 cDNA を合成する。この合成は常法によって行うことができる。得られた第 1 鎖 cDNA を用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ 2 種類のプライマーを用いて PCR に供し、目的とする新規蛋白 DNA を増幅する。また、cDNA を合成せずとも、市販の cDNA を用いてもよい。得られた DNA をアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記 DNA を制限酵素等で切断し、接続することによって目的とする DNA 断片を得ることもできる。

#### b) 第 2 製造法

本発明の遺伝子は上述の製造法その他、常法の遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。まず、前述の方法で得た mRNA を鋳型として逆転写酵素を用いて 1 本鎖 cDNA を合成した後、この 1 本鎖 cDNA から 2 本鎖 cDNA を合成する。その方法としては S 1 ヌクレアーゼ法 (Efstratiadis, A. et al., Cell, 7, 279-288, 1976)、Land 法 (Land, H. et al., Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266, 1981)、O. Joon Yoo 法 (Yoo, O. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053, 1983)、Okayama-Berg 法 (Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol., 2, 161-170, 1982) などが挙げられる。

次に、上述の方法で得られる組換えプラスミドを大腸菌、例えば DH5  $\alpha$  株、HB101 株、JM109 株等に導入して形質転換させて、テトラサイクリン、アンピシ

リン、カナマイシン等に対する薬剤耐性を指標として組換え体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合には Hanahan の方法 (Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166, 557-580, 1983)、すなわち  $\text{CaCl}_2$  や  $\text{MgCl}_2$  または  $\text{RbCl}$  を共存させて調製したコンピテント細胞に該組換え DNA 体を加える方法により実施することができる。もちろん、市販のコンピテント細胞を使用しても構わない。なお、ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。

上記により得られる形質転換株から、目的の新規蛋白の DNA を有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

①合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

本発明の新規蛋白の全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し (この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のどちらでもよく、また後者の場合、イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる)、これをプローブ ( $^{32}\text{P}$  又は  $^{33}\text{P}$  で標識する) として、形質転換株の DNA を変性固定したニトロセルロースフィルターやナイロンフィルターとハイブリダイズさせ、得られた陽性株を検索して、これを選択する。

②ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法

本発明の新規蛋白の一部に対応するセンスプライマーとアンチセンスプライマーのオリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応 (Saiki, R. K. et al., Science 239, 487-491, 1988) を行い、目的の新規蛋白の全部又は一部をコードする DNA 断片を増幅する。ここで用いる鋳型 DNA としては、該新規蛋白を産生する細胞の mRNA より逆転写反応にて合成した cDNA、またはゲノム DNA を用いることができる。このようにして調製した DNA を断片を  $^{32}\text{P}$  又は  $^{33}\text{P}$  で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼ

ーションまたはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。

③他の動物細胞で新規蛋白を産生させてスクリーニングする方法

形質転換株を培養し、遺伝子を増幅させ、その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし（この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミドもしくは動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれでもよい）、遺伝子にコードされた蛋白を細胞外に産生させる。本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて該新規蛋白を検出することにより、元の形質転換株より目的の新規蛋白をコードする cDNA を有する株を選択する。

④本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて選択する方法

あらかじめ、cDNA を発現ベクターに組み込み、形質転換株の培養上清、細胞内もしくは細胞表面に蛋白を産生させ、本発明の新規蛋白に対する抗体および該抗体に対する 2 次抗体を用いて、所望の新規蛋白産生株を検出し、目的の株を選択する。

⑤セレクトィブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法

形質転換株から得られる cDNA を、ニトロセルロースフィルター等にブロットし、本発明の新規蛋白産生細胞からの mRNA をハイブリダイズさせた後、cDNA に結合した mRNA を解離させ、回収する。回収された mRNA を蛋白翻訳系、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等の無細胞系で蛋白に翻訳させる。本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて検出して、目的の株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明の新規蛋白をコードする DNA を採取する方法は、公知の方法 (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 等の遺伝子操作実験マ



ニュアルに従い実施できる。例えば細胞よりプラスミド DNA に相当する画分を分離し、該プラスミド DNA より cDNA 領域を切り出すことにより行ない得る。

#### c) 第3製造法

本発明の新規蛋白遺伝子は、化学合成法によって製造した DNA 断片を結合することによっても製造できる。各 DNA は、DNA 合成機 [例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman 社製)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems 社製) など] を用いて合成することができる。

#### d) 第4製造法

本発明の新規蛋白遺伝子は、新規蛋白の情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法 (Hunkapiller, M. et al., Nature, 10, 105-111, 1984) 等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる (Crantham, R. et al., Nucleic Acids Res., 9, r43-r74, 1981)。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス (site specific mutagenesis) (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984) 等に従うことができる。

以上、a) 乃至 d) により得られる DNA の配列決定は、例えばマキシムーギルバートの化学修飾法 (Maxam, A. M. and Gilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980) やジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. and Vieira, J., Gene, 19, 269-276, 1982) 等により行うことができる。

### 2) 本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組み換え蛋白の製造方法

単離された本発明の新規蛋白をコードする遺伝子を含む断片は、適当なベクター DNA に再び組込むことにより、真核生物および原核生物の宿主細胞を形質

転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、サルの細胞である COS 細胞 (Gluzman, Y. Cell, 23, 175-182, 1981) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞および同細胞に Epstein Barr Virus の EBNA-1 遺伝子を導入した 293-EBNA 細胞 (Invitrogen 社製) 等がよく用いられるが、これらに限定されるわけではない。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Subramani, S., et al. Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981)、ヒトの elongation factor プロモーターを有する pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、cytomegalovirus プロモーターを有する pCEP4 (Invitrogen 社製) 等を例示できるが、これらに限定されない。

宿主細胞として、COS 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40 複製起点を有し、COS 細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよび RNA スプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. and Takebe, Y., Med. Immunol., 20, 27-32, 1990)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、pCDM8 (Seed, B., Nature, 329, 840-842, 1987) 等が挙げられる。該発現ベクターは DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. and

Magnusson, G., Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-DNA 共沈殿法 (Graham, F. L. and van der Ed, A. J., Virology, 52, 456-457, 1973)、FuGENE™6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim 社製) を用いた方法、および電気パルス穿孔法 (Neumann, E. et al., EMBO J., 1, 841-845, 1982) 等により COS 細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

また、宿主細胞として CHO 細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418 耐性マーカーとして機能する neo 遺伝子を発現し得るベクター、例えば pRSVneo (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) や pSV2-neo (Southern, P. J. and Berg, P., J., Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982) 等をコ・トランスフェクトし、G418 耐性のコロニーを選択することにより新規蛋白を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として 293-EBNA 細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virus の複製起点を有し、293-EBNA 細胞で自己増殖が可能な pCEP4 (Invitrogen 社製) などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

上記で得られる所望の形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞外に本発明の新規蛋白が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記 COS 細胞であれば RPMI-1640 培地やダルベッコ修飾イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に必要に応じ牛胎児血清 (FBS) 等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記 293-EBNA 細胞であれば牛胎児血清 (FBS) 等の血清成分を添加したダルベッコ修飾イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

上記により、形質転換細胞の細胞外に生産される本発明の新規蛋白は、該新規蛋白の物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法によ

り、分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば該新規蛋白を含む培養液を通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。

本発明の新規蛋白はマーカ配列とインフレーションで融合して発現させることで、該新規蛋白の発現の確認、精製等が可能になる。マーカ配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitope などがある。また、マーカ配列と該新規蛋白の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンピンなどのプロテアーゼが認識する特異的なアミノ酸配列を挿入することにより、マーカ配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。

### 3) 本発明の蛋白のアグリカナーゼ活性を検出する方法

本発明の蛋白のアグリカナーゼ活性は、本発明の関節疾患アグリカナーゼと以下に挙げる基質とを適当な緩衝液中で混合し、反応させた後、それぞれの基質にあった方法で検出することができる。

基質としては、ヒトもしくは他の動物の軟骨・組織より精製したアグリカン、あるいは遺伝子組換えアグリカン、市販のアグリカン（生化学工業製）、もしくはそれらの部分蛋白を用いることができる。これらの基質と被試験プロテアーゼを含む細胞・組織培養液、細胞・組織抽出液もしくは（部分）精製標品を反応させ、Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup>の間で切断された断片を検出することによりアグリカナーゼ活性を測定することができる。Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup>の間で切断された断片の検出には、常法に従い分解断片のN末端配列もしくはC末端配列を決定する手法や、より簡便にGlu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup>の間で切断されることにより生じるC末端のNITGE<sup>373</sup>、N末端の<sup>374</sup>ARGSVを特異的に認識する抗ネオエピトープ抗体

(Hughes C. E. et al., Biochem J., 305, 799-804, 1995) を用いた ELISA (Enzyme Linked Immuno Solvent Assay) やウエスタンブロッティング等の免疫学的手法を用いることができる。好ましくは、実施例 7 および 9 記載の方法で実施することができる。

#### 4) 本発明の新規蛋白に反応する抗体の作製方法

本発明の新規蛋白に反応する抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体は、各種動物に該新規蛋白や該新規蛋白の断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明新規蛋白をコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いて DNA ワクチン法 (Raz, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523, 1994; Donnelly, J. J. et al., J. Infect. Dis., 173, 314-320, 1996) によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は該新規蛋白またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁し、腹腔、皮下また静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。このように製造されたポリクローナル抗体は常法の蛋白質単離精製法により、分離精製することができ、常法の蛋白質単離精製法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテイン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。

モノクローナル抗体は、ケーラーとミルスタインの細胞融合法 (Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975) により当業者が容易に製造することが可能である。

すなわち、本発明新規蛋白またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁した乳濁液を数週間おきにマウスの腹腔、皮下または静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損やチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを持つミエローマ細胞、例えば、マウスミエローマ細胞株 P3X63Ag8. U1、を利用する。また、融合剤としてはポリエチレングリコールを利用する。さらにはハイブリドーマ作製における培地として、イーグル最小必須培地、ダルベッコ修飾最小必須培地、RPMI-1640 などの通常よく用いられているものに適宜 10～30%の牛胎児血清を加えて用いる。融合株は HAT 選択法により選択する。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA 法、免疫組織染色法などの周知の方法または前記のスクリーニング法により行い、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択する。また、限界希釈法によって、サブクローニングを繰り返すことによりハイブリドーマの単クローン性を保証する。このようにして得られるハイブリドーマは培地中で数日間、あるいはプリスタンで前処理した BALB/c 系マウスの腹腔内で 10～20 日培養することで精製可能な量の抗体が産生される。このように製造されたモノクローナル抗体は培養上清あるいは腹水から常法の蛋白質単離精製法により分離精製することができる。

以上のように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パパイン等の蛋白質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法の蛋白質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、 $F(ab')_2$ 、Fab、Fab'、Fv を得ることができる。

さらには、本発明新規蛋白に反応する抗体を、クラクソンらやゼベデらの方法 (Clackson, T. et al., Nature, 352, 624-628, 1991; Zebedee, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179, 1992) により single chain Fv や Fab として得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス (Lonberg, N. et al., Nature, 368, 856-859, 1994) に免疫することでヒト抗体を得ることも可能である。

### 5) 本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニング方法

3) に示したアグリカナーゼ活性の検出法と同様の方法でスクリーニングが可能である。また、本発明の新規蛋白と反応させることにより分解され消滅・減少する添加したアグリカン、組換えアグリカン、市販のアグリカン、もしくはそれらの部分蛋白量を、アグリカナーゼで切断される部位の N 側および C 側部分のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて計測する実施例 10-2 に例示するような ELISA などの方法を用いることができる。さらには、本発明の新規蛋白と実施例 7-1 に例示するような N 末に FLAG タグ、C 末に His タグが付加した組換えアグリカンを反応させて分解され消滅・減少する添加した組換えアグリカン量を抗 FLAG タグ、抗 HIS タグ抗体を用いた ELISA 等で計測する方法が用いられる。この場合のタグは FLAG タグおよび His タグに限定されず、また、組換えアグリカンは実施例 7-1 に限定されず、本蛋白によりアグリカナーゼ切断部位で切断されるアグリカンの部分蛋白もしくは改変蛋白であればよい。アグリカナーゼ活性に用いる被験物質は、被験物質としては従来金属プロテアーゼ阻害活性を有することは知られているが該新規蛋白のアグリカナーゼ活性に対して阻害するかが不明な化合物またはペプチド、あるいは種々の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Terrett, N. K. et al., Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995) や通常の合成技術を用いて合成された化合物群やファージ・ディスプレイ法 (Felici, F. et al., J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991) などを応用して作製されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の抽出物や培養上清、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に構造修飾した化合物またはペプチドを用いる。

本発明の新規蛋白のアグリカナゼ活性を阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体及び抗体断片）のスクリーニングには、本発明の新規蛋白またはその部分ペプチドの基質となるものであればいずれのものでも使用可能であり、好ましくは前記3）に記載の基質である。

#### 6) プロテオグリカンの分解・遊離検出方法

軟骨プロテオグリカンの分解・遊離の検出、計測には、実施例 11-2 に例示される  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  をトレーサーとして用いる方法、プロテオグリカン抗体を用いる方法、ゲルろ過により分解断片を検出する方法（Methods in Cartilage Research, Academic Press Limited., 1990; Joint Cartilage Degradation, Marcel Dekker, Inc., 1993）や、1, 9-dimethylmethylen blue (DMMB) を用いた比色法（Goldberg R. L. and Kolibas L. M., Connect. Tissue Res., 24, 265-275, 1990）などが用いられるが、これらに限定されない。

#### 7) 本発明のプロモーター活性を阻害する物質のスクリーニングの方法

本発明のプロモーター活性を阻害する物質をスクリーニングする際、そのプロモーター活性を検出する方法としては、実施例 13 に示した配列（配列番号 24 乃至 31）およびその部分配列が有するレポーター遺伝子プラスミドを用いる方法が簡便である。レポーター遺伝子とは通常的手段（例えば、酵素活性の測定等、当業者に既知の定量法）によって定量することができる蛋白をコードする遺伝子を指し、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ遺伝子がよく用いられているがこれらに限定されない。レポーター遺伝子プラスミドを構築する基となるベクターに関しては制限はなく、市販のプラスミドベクター、例えば、pGV-B2（東洋インキ社製）や pSEAP2-Basic（Clontech 社製）などを用いることができる。これらのベクターのレポーター遺伝子の上流に当該配列を順方向に挿入したレポーター遺伝子プラスミドを構築し、このプラスミドで形質転換した細胞において発現されるレポーター蛋白の量をそれぞれに適した方法で測定



することにより当該配列のプロモーター活性の有無、強度を知ることができ、また、上記形質転換細胞の培養液に被験物質を添加することにより、被験物質の当該プロモーター活性に及ぼす作用を検出することができる。

本発明の配列番号の配列およびその部分配列の有するプロモーター活性を阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体及び抗体断片）のスクリーニングには、上記のプロモーター活性を検出する方法と同様の方法を用いることができる。被験物質としては従来プロモーター活性を阻害することは知られているが配列番号 24 乃至 31 の配列およびその部分配列の有するプロモーター活性を阻害するかが不明な化合物またはペプチド、あるいは種々の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術（Terrett, N. K. et al., Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995）や通常の合成技術を用いて合成された化合物群やファージ・ディスプレイ法（Felici, F. et al., J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991）などを応用して作製されたランダム・ペプチド群、抗体及び抗体断片を用いることができる。また、微生物の抽出物や培養上清、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に構造修飾した化合物またはペプチドを用い得る。

本発明には、前記スクリーニング法により選択される「関節疾患アグリカナゼ」のアグリカナゼ活性を有意に阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体及び抗体断片）を有効成分とする医薬が包含され、特に医薬として好ましくはプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物である。「関節疾患アグリカナゼ」の活性を有意に阻害する物質としては、実施例 10-2 で示されるスクリーニング系で選択された、 $N^{\alpha}$ -[2-(1-ヒドロキシカルバモイル-2-スルファニルエチル)-4-メチルペンタノイル]-N, O-ジメチルチロシンアミド（以下、化合物 A とする）、 $N^{\alpha}$ -[2-(1-ヒドロキシカルバモイル-2

ースルファニルエチル)ー4ーメチルペンタノイル]ーNーメチルフェニルアラニンアミド(以下、化合物Bとする)、 $N^{\alpha}$ ー[2ー(1ーヒドロキシカルバモイルー2ーフェニルスルファニルエチル)ー4ーメチルペンタノイル]ーN, Oージメチルチロシンアミド(以下、化合物Cとする)、 $N^{\alpha}$ ー[2ー(1ーヒドロキシカルバモイルー2ーメチルスルファニルエチル)ー4ーメチルペンタノイル]ーN, Oージメチルチロシンアミド(以下、化合物Dとする)などが挙げられる。上記化合物A、化合物B、化合物C及び化合物Dは、W090/05719の請求の範囲に含まれる化合物であるが、本発明はそれらの化合物を有効成分とする医薬に限らず、「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を有意に阻害する物質を有効成分とする医薬であれば全て包含される。尚、上記化合物A、化合物B、化合物C及び化合物DはW090/05719に収載された製造方法に準じてW090/05719に収載された化合物と同様に合成することができる。

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を有意に阻害する物質(化合物、ペプチド、抗体または抗体断片)を有効成分とする製剤は、該有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製されうる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注、関節注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃で消化されるペプチドにあっては静注等の非経口投与が望まれる。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、

溶解乃至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80等を含む。該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでいてもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。

投与量は前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重60kgとして）において、1日につき約0.1～1000mg、好ましくは0.1～100mgである。非経口投与の場合、注射剤の形では1日につき約0.01～1000mg、好ましくは0.01～100mgである。

#### 図面の簡単な説明

図1は実施例6で得られた、ECL ウェスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6TSP1の動物細胞株での発現結果を示す写真である。

図 2 は実施例 7-2 で得られた、ECL ウェスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6TSP1 の組換えアグリカン G1G2 分解活性の検出結果を示す写真である。

図 3 は実施例 7-3 で得られた、ウェスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6TSP1 で分解された組換えアグリカン G1G2 の抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体による解析結果を示す写真である。

図 4 は実施例 8 で得られた、IL-1  $\beta$  による MDTS6 mRNA の発現誘導を検討した結果を示す電気泳動パターン写真である。

図 5 は実施例 9-2 で得られた、MDTS6 蛋白による天然型アグリカンの分解をウェスタンブロッティング検出システムを用い、抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体で検出した結果を示す写真である。

図 6 は実施例 11-2 で得られた、ウサギ膝関節初代培養細胞からの all-trans レチノイン酸および IL-1  $\beta$  によるプロテオグリカンの遊離を検出した結果を示すグラフである。

図 7 は実施例 11-3 で得られた、ウサギ膝関節初代培養細胞を all-trans レチノイン酸および IL-1  $\beta$  処理した場合の MDTS6 の遺伝子発現変動を RT-PCR 法により解析した結果を示す電気泳動パターン写真である。

図 8 は実施例 12 で得られた、all-trans レチノイン酸によるウサギ膝関節初代培養細胞からのプロテオグリカンの分解・遊離が化合物 A および化合物 B により抑制されることを示したグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に具体的に説明する。

特に断りのない限り、公知の方法 (Sambrook, J. et al.; "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 等

の遺伝子操作実験マニュアルに従ったが、本発明は実施例に限定されるものではない。

#### (実施例 1) 新規 ADAMTS 遺伝子 MDTS6 の部分配列の発見

ヒト脳由来 cDNA ライブラリーは文献 (Ohara O. et al., DNA Res., 4, 53-59, 1997) に示すように挿入配列の大きさによって厳密に分画されたものを構築した。これらのサブライブラリーの cDNA 断片のサイズ分布は 3kbp-8kbp である。このライブラリーを構成するクローンの 5'-及び 3'-末端の配列を解読し、自家製の EST データバンクを構築した。この中から、MDTS6 の部分配列を得た。

#### (実施例 2) MDTS6 の全長 ORF 配列の決定

MDTS6 の cDNA クローンの配列を決定することにより、配列番号 2 の 832 番から 2853 番の配列を得た。配列番号 2 の 1 番から 831 番の配列は、Clontech 社製のヒト脳およびヒト胎盤の Marathon-Ready™ cDNA を鋳型、LA-Taq™ (宝酒造社製) を DNA ポリメラーゼとして、RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) を繰り返すことにより取得した。その結果、全長 MDTS6 は、配列番号 1 に示すように 950 アミノ酸からなる新規蛋白であることが判明した。そのドメイン構造は N 末から、分泌シグナル配列、プロ領域、furin プロテアーゼ認識配列、金属プロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、トロンボスポンジン I 型繰り返し配列 (以下、TSP-I 繰り返し配列という)、Cys 残基に富むドメイン、中間領域、TSP-I 繰り返し配列 2 個であり、ADAMTS ファミリーに属する分子であった (Kuno, K. et al., J. Biol. Chem., 272, 556-562, 1997; Tang, B. L. et al., FEBS Lett., 445, 223-225, 1999)。

#### (実施例 3) C 末 FLAG 付加型発現ベクターの作製

pCEP4 (Invitrogen 社製) を制限酵素 ClaI、NsiI で切断し、平滑末端化後、自己連結反応を行い、EBNA1 発現ユニットを除去した発現ベクター pCEP4d を作製した。このベクターを制限酵素 NheI、BamHI で切断し、アガロースゲル抽出した約 7.7kbp の断片に、配列番号 3 で示される核酸と配列番号 4 で示される核

酸をアニールさせた重鎖オリゴヌクレオチドを挿入して、目的の配列を有するクローンを選択し、pCEP4d-FLAG と命名した。このベクターを鋳型、配列番号 5 で示されるオリゴ DNA、配列番号 6 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、PyroBest™ DNA ポリメラーゼを用いて PCR 反応を行った。生じた約 0.4kbp の DNA 断片を制限酵素 SpeI で切断し、XbaI で切断した pCEP4d-FLAG (約 7.7kbp) に挿入し、目的通りプロモーターよりクローニングサイトの XbaI、NheI、NotI、BamHI 認識配列そして FLAG タグという順になっているクローンを選択して、pCEP4dE2-FLAG を完成した。

#### (実施例 4) MDTs6 短長蛋白 (MDTs6TSP1) 発現プラスミドの構築

配列番号 1 の 1 番から 583 番 (MDTs6 の N 末から TSP1 繰り返し配列を含む領域 (以下 MDTs6TSP1 とする) に相当する部分) を C 末に FLAG を付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号 2 の 1 番から 1749 番の遺伝子を PCR により取得した。配列番号 7 と配列番号 8 で示されるオリゴ DNA をプライマー、ヒト胎盤の Marathon-Ready™ cDNA (Clontech 社製) を鋳型、LA-Taq™ (宝酒造社製) を DNA ポリメラーゼとして、94℃1 分の後、98℃10 秒、68℃2 分のサイクルを 10 回行った。この反応液を 50 倍希釈した DNA 溶液を鋳型として、PyroBest™ DNA ポリメラーゼを用い、94℃2 分の後、98℃10 秒、66℃30 秒、74℃4 分のサイクルを 40 回、続いて 72℃10 分の条件で PCR を行った。こうして生成した 5' 側に XbaI 認識配列および Kozak 配列を、3' 側に NotI 認識配列が付加された目的断片を PCR-Blunt にサブクローンして配列を確認した後、制限酵素 XbaI、NotI で切断し、pCEP4dE2-FLAG の XbaI、NotI 部位に挿入して、pCEP-MDTs6TSP1-FLAG を完成した。

#### (実施例 5) MDTs6 全長蛋白発現プラスミドの構築

配列番号 1 の 1 番から 950 番を C 末に FLAG を付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号 2 の 1534 番から 2850 番の遺伝子を PCR により取得した。詳しくは、配列番号 9 と配列番号 10 で示されるオリゴ DNA をプライマー、EST クローンのプラスミド DNA を鋳型、PyroBest™ DNA ポリメラーゼを DNA ポリメラーゼとして、94℃1 分の後、98℃10 秒、50℃15 秒、72℃2 分のサイクルを 20 回、続いて 72℃7 分の反応を行った。なお、EST クローンのプラスミド DNA を鋳型とする代わりに、ヒト胎盤の Marathon-Ready™ cDNA (Clontech 社製) を鋳型、配列番号 9 と配列番号 10 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、94℃2 分の後、98℃10 秒、68℃2 分のサイクルを 40 回、続いて 72℃7 分の反応条件で PCR を行うことにより、目的断片を生成することができた。こうして生成した 3' 側に NotI 認識配列が付加された目的断片を PCR-Blunt にサブクローンして配列を確認し、pCRB-MDTS6-3H とした。

配列番号 2 の 1566 番から 1571 番に BamHI 認識配列があることを利用し、pCEP-MDTS6TSP1-FLAG を制限酵素 XbaI、BamHI で切断して生じた約 1.6kbp の DNA 断片と、pCRB-MDTS6-3H を BamHI、NotI で切断して生じた約 1.3kbp の DNA 断片を連結し、pCEP4dE2-FLAG の XbaI、NotI 部位に挿入して、pCEP-MDTS6F-FLAG を完成した。

#### (実施例 6) MDTS6TSP1 及び MDTS6 全長蛋白の動物細胞株での発現

実施例 4 において pCEP4dE2-FLAG を骨格として作製した発現プラスミドを FuGENE™6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim 社製) を用いて添付指示書に従い HEK293-EBNA 細胞 (invitrogen 社製) に導入した。プラスミド導入後、1-2 日間培養して得た培養上清中に目的蛋白が存在することを、C 末端に付加した FLAG タグに対する抗体 (マウス抗 FLAG モノクローナル抗体 (M2; Sigma 社製) を用いたウエスタンブロッティングで確認した。すなわち、上記培養上清を SDS/10%~20% アクリルアミドゲル (第一化学薬品社製) を用いて電気泳動後、ブロッティング装置を用いて PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜に、ブロックエース (大日本製薬社製) を添加してブロッキングした後、マウス抗

-30-

FLAG モノクローナル抗体 (M2 ; Sigma 社製) 、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Zymed 社製もしくは TAGO 社製) を順次反応させた。または、ブロッキング後、ビオチン化 M2 抗体 (Sigma 社製) 、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Amasham 社製) を順次反応させた。反応後、ECL ウェスタンブロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社製) を用いて該蛋白の発現を確認した (図 1) 。発現された蛋白の分子量はアミノ酸配列から算出される値よりも約 23K 小さかった。上述の如く HEK293-EBNA 細胞にて発現させた MDTS6TSP1 の N 末端配列は、C 末端に FLAG タグが付加していることを利用して、実施例 7-1 の方法でアフィニティ精製した後、PVDF 膜に転写し、Ponceau S 染色された MDTS6TSP1 の N 末端配列を ABI 社 494 型ペプチドシーケンサーで解析することにより決定した。その結果、配列番号 1 の 213 番目の Phe から始まっており、他の ADAMTS 分子同様に、プロ領域と金属プロテアーゼドメインの間にある furin プロテアーゼ認識配列で切断され成熟蛋白 (配列番号 1 の 213 番から 583 番) になることが示された。また、MDTS6 全長蛋白についても実施例 5 で得られた発現プラスミドを用い、上記 MDTS6TSP1 の蛋白発現と同様に取得し、MDTS6TSP1 と同様に、プロ領域と金属プロテアーゼドメインの間にある furin プロテアーゼ認識配列で切断され成熟蛋白 (配列番号 1 の 213 番から 950 番) になることを確認した。

#### (実施例 7) 動物細胞を宿主に発現した MDTS6TSP1 蛋白の酵素活性の検出

##### (実施例 7-1) 組換えアグリカン G1G2 の調製

報告されているヒトアグリカンの遺伝子配列 (Doege K, et al. Biochem Soc Trans., 18, 200-202, 1990) をもとに合成した配列番号 11 と配列番号 12 で示されるオリゴ DNA をプライマー、ヒト胎盤の Marathon-Ready™ cDNA を鋳型、PyroBest™ DNA ポリメラーゼを DNA ポリメラーゼとして、94℃1 分の後、98℃10 秒、68℃2 分のサイクルを 40 回、続いて 68℃7 分の反応を行った。生成した DNA 断片を制限酵素 BamHI で切断し、pCEP-SigFla の BamHI 部位に導入し、ヒト



-31-

アグリカンの球状ドメイン 1 (G1) -球状ドメイン 2 (G2) の N 末に FLAG タグ、C 末に His タグの付加した蛋白を発現するために用いる発現プラスミド pCEP-rAgg を作製した。pCEP-SigFla は pCEP4d の HindIII、XhoI 部位に配列番号 13 と配列番号 14 で示されるオリゴ DNA の二重鎖を導入したものであり、プロモーターの下流に、文献 (Guan X-M. et al., J. Biol. Chem. 267, 21995-21998, 1992) に示されたインフルエンザウィルスの hemagglutinin 由来の分泌シグナル配列と FLAG タグ配列、続いて、BamHI 認識配列を有する発現ベクターである。

pCEP-rAgg を HEK293-EBNA 細胞に導入し、3-7 日培養して目的蛋白を発現、生産した。培養液上清からの目的蛋白の精製は、N 末端に FLAG タグが付加していることを利用して、アフィニティ精製した。すなわち、培養上清をカラムに詰めた M2-agarose (Sigma 社製) にアプライし、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)/150 mM NaCl (以下、TBS という) で洗浄した後、0.1M Gly-HCl (pH 3.0) で、溶出、分画し、直ちに 1M Tris-HCl (pH 8.0) で中和した。

#### (実施例 7-2) MDT56TSP1 蛋白の組換えアグリカン G1G2 分解活性の検出

実施例 6 において、発現プラスミド導入後 12-16 時間で培地を無血清に置換した後、さらに 32-36 時間培養を継続し、培養上清を回収した。この培養上清と上記で調製した組換えアグリカンを混合し、37℃で 1 夜反応させ、SDS-PAGE 後、実施例 6 に記載した方法で、PVDF 膜に転写、ブロッキング後、抗 Hisx6 ポリクローナル抗体 (sc-803; Santa Cruz Biotechnology 社製)、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (MBL 社製) を順次反応させた。反応後、ECL ウェスタンブロットティング検出システム (アマシャムファルマシア社製) を用いて組換えアグリカンを検出した。その結果、発現プラスミドのみを導入したコントロールではみられない組換えアグリカンの分解物が検出された (図 2)。

#### (実施例 7-3) 抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体による解析

アグリカナーゼはアグリカンの Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup> の間を選択的に切断する金属プロテアーゼである。この切断により生じた C 側のネオエピトープを認識する抗体を常法に従い、配列番号 32 で示される合成ペプチドと KLH とのコンジュゲートをマウスに 5 回免疫を繰り返すことにより調製した。実施例 7-2 と同様に転写、ブロッキングした PVDF 膜とこの抗体を反応させ、続いて、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Tago 社製) と反応させた後、ECL ウェスタンブロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社製) を用いて検出した。その結果、MDTS6 により生じた組換えアグリカン G1G2 分解物が抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体と反応し、検出されたバンドの分子量は実施例 7-2 で検出された分解物の分子量と一致した (図 3)。アグリカナーゼネオエピトープを認識する BC-3 抗体 (Hughes C. E. et al, Biochemical J. 305, 799-804, 1995) でも同じ結果が得られた。

#### (実施例 8) IL-1 による MDTS6 mRNA の発現誘導

マウス細胞株 ATDC5 はインスリン処理により軟骨様細胞へと分化することが知られている (Atsumi T. et al., Cell Differ. Dev. 30, 109-116, 1990)。I 型コラーゲンコート 6 ウエルプレート (旭テクノグラス社製) に ATDC5 細胞を  $4 \times 10^5$ /well で蒔き、DMEM/HamF12(1:1)/5%FCS 培地で 2 日間培養した後、インスリン (終濃度 30ng/ml)、50  $\mu$ g/ml L-アスコルビン酸含有 DMEM/HamF12(1:1)/5%FCS 培地に交換し 5 日培養を継続し、IL-1  $\beta$  (終濃度 5ng/ml) を添加して 0、1、2、4、8 時間処理した。各処理群より ISOGEN (日本ジーン社製) を用いて total RNA を調製し、その 1  $\mu$ g を鋳型として、BcaBEST<sup>TM</sup> RNA PCR Kit (宝酒造社製) を用い RT-PCR を行った。逆転写反応は添付の指示書に従い、Oligo dT-Adaptor primer をプライマーとして行い、PCR は MDTS6 の 3' 非翻訳領域の配列を基に合成した配列番号 15 および配列番号 16 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、94℃ 2 分の後、94℃ 30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 30 秒のサイクルを 40 回、続いて 72℃ 7 分の反応で行った。反応液を 1%アガロ

ースにて電気泳動し、生成した約 0.3kbp のバンドの濃さを比較した。その結果、MDTS6 mRNA は IL-1 により一過性に発現誘導されることが判明した（図 4）。

（実施例 9）MDTS6 による天然型アグリカン分解

（実施例 9-1）各種短長 MDTS6 蛋白の発現と組換えアグリカン G1G2 分解活性  
pCEP4dE2-FLAG を骨格として作製した発現プラスミドを FuGENE™6

Transfection Reagent（Boeringer Mannheim 社製）を用いて添付指示書に従い HEK293-EBNA 細胞（invitrogen 社製）に導入した。プラスミド導入後、1 夜培養後、PBS 緩衝液で洗い、無血清培地に交換し、さらに 2-3 日間培養した。この培養液を 9,000rpm、10 分で遠心分離し、上清を MDTS6 の酵素源とした。この際、実施例 4 および実施例 5 で示した発現プラスミド以外に、各種短長 MDTS6 蛋白の発現プラスミドとして、配列番号 1 の 1 番から 447 番のアミノ酸の C 末に配列番号 33 で示されるポリペプチドが付加した蛋白（以降、MDTS6Pro とする）、配列番号 1 の 1 番から 518 番のアミノ酸の C 末に配列番号 33 で示されるポリペプチドが付加した蛋白（以降、MDTS6Dis とする）、配列番号 1 の 1 番から 687 番のアミノ酸の C 末に配列番号 33 で示されるポリペプチドが付加した蛋白（以降、MDTS6Cys とする）の 3 つの蛋白の発現プラスミドをデザインした。すなわち、MDTS6Cys の発現プラスミドは、実施例 5 で構築した全長蛋白発現プラスミドを鋳型、配列番号 7 と配列番号 17 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、PyroBest DNA polymerase を用いた PCR にて増幅した遺伝子を制限酵素 XbaI、NotI で切断し pCEP4dE2-FLAG の XbaI、NotI 部位に挿入して構築した。また、MDTS6Pro の発現プラスミド、及び、MDTS6Dis の発現プラスミドは、上記 MDTS6Cys で作製したプラスミドと同様に作製し、具体的には PyroBest DNA polymerase を用いた PCR にて増幅した遺伝子を制限酵素 XbaI、NotI で切断し pCEP4dE2-FLAG の XbaI、NotI 部位に挿入して構築した。但し、PCR のプライマーとしては、MDTS6Pro の場合は、配列番号 7 で示されるオリゴ DNA と配列番号 34 で示され

るオリゴ DNA を用い、MDTS6Dis の場合は、配列番号 7 で示されるオリゴ DNA と配列番号 35 で示されるオリゴ DNA の組み合わせをそれぞれ用いた。

上述の各種 MDTS6 蛋白 (MDTS6Cys、MDTS6Pro、MDTS6Dis) の蛋白発現は、(実施例 6) に記載の MDTS6TSP1 及び MDTS6 全長蛋白の動物細胞株での発現と同様に発現させた。上述の各種 MDTS6 蛋白のアグリカナーゼ活性を実施例 7-3 の方法で検討した結果、MDTS6Cys を発現した培養上清にはアグリカナーゼ活性が検出されたが、MDTS6Pro、MDTS6Dis を発現した培養上清にはアグリカナーゼ活性が検出されなかった。なお、発現された主要な蛋白の分子量はアミノ酸配列から計算される値よりも約 23K 小さく、実施例 6 で示された MDTS6TSP1 と同じく、furin プロテアーゼ認識配列でプロ領域が切断・除去された成熟蛋白であった。この結果、N 末から数えて 1 個目の TSP-1 繰り返し配列が MDTS6 のアグリカナーゼ活性の発揮に必須であることが判明した。

#### (実施例 9-2) 天然型アグリカンの分解

実施例 9-1 で調製した MDTS6 酵素液 90  $\mu$  l と天然型アグリカン (生化学工業社製) 10  $\mu$  g/10  $\mu$  l TBS を試験チューブ内で混合し、37℃ で一夜反応させた。この反応産物を SpeedVac にて乾燥した後、Chondroitinase ABC 0.06 単位 (生化学工業社製)、keratanase I 0.024 単位 (生化学工業社製)、keratanase II 0.0004 単位 (生化学工業社製)、5  $\mu$  M PMSF、10mM EDTA を含む 10mM Tris-Acetate 緩衝液 (pH7.6) 100  $\mu$  l に溶解し、37℃ で一夜反応させた。この反応液の一部を SDS-PAGE 後、実施例 7-3 に示す通りにマウス抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体で検出した。この際、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG ポリクロナル抗体は Biosource 社製を用いた。アグリカナーゼネオエピトープを認識する BC-3 抗体 (Hughes C. E. et al, Biochemical J. 305, 799-804, 1995) でも同じ結果が得られた。

その結果、MDTS6Cys では約 150KDa のバンドに加え、80-90KDa のバンドが検出された。この切断パターンはヒトの OA、RA を含む関節疾患患者の関節滑

液中に認められる主要な分子（いずれもアグリカナーゼ分解で生じた）のパターン（Sandy J. D. et al, J. Clin. Invest., 89, 1512-1516, 1992; Lohmander L. S. et al., Arthritis Rheum. 36, 1214-1222, 1993）に一致し、また、ヒト膝関節軟骨の器官培養系において IL-1、レチノイン酸処理 12-24 時間で生じる主要なアグリカナーゼネオエピトープを有する分子のパターン（Little C. B. et al., Biochemical J., 344, 61-68, 1999）に一致した（図 5）。

#### （実施例 10）アグリカナーゼ活性を修飾する物質のスクリーニング系

##### （実施例 10-1）MDTS6Cys および基質の調製

MDTS6Cys は精製せずとも実施例 9-1 の方法で調整した培養上清で上記組換えアグリカン GIG2 および天然型アグリカン Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup>（以下、"aggrecanase site"）の間を切断することを、実施例 9-2 に示したウエスタンブローディングを用いた方法で確認した。また、実施例 9-1 で無血清培地に置換せず、10%FBS 含有培地で培養を継続した培養上清を用いても、"aggrecanase site"での切断が認められた。そのため、基質としては実施例 7-1 で調製した組換えアグリカン GIG2 を用いた。

##### （実施例 10-2）スクリーニング系

組換えアグリカンおよび天然型アグリカンを基質に実施例 7-2 に示したウエスタンブローディングを用いた方法でスクリーニング可能であるが、より大量の被験化合物をスクリーニングするために下記の ELISA 系を構築した。

MDTS6Cys 培養上清、組換えアグリカン GIG2、被験化合物を混合し、37℃にて数時間反応させた産物を 96 穴プレート（Nunc-Immuno™ Plate MaxiSorp™ Surface #439454 ; Nunc 社製）に吸着させ、1%BSA/TBS 溶液でブロッキングした後、マウス抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体、続いて HRP コンジュゲート抗マウス IgG 抗体（Biosource 社製）を反応させ、添付説明書の条件にしたがい TMB Peroxidase EIA Substrate Kit（Bio-Rad 社製）で検出し、発色阻害を指標に被験化合物のアグリカナーゼ活性阻害強度を算出した。また、その変法

として、組換えアグリカンを予め 96 穴プレート (Nunc 社製) に吸着させ、1%BSA/TBS 溶液でブロッキングした後、MDTS6Cys 培養上清と被験化合物を添加し、37℃にて数時間反応させた後、同様にマウス抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体、続いて HRP コンジュゲート抗マウス IgG 抗体 (Biosource 社製) を反応させ、TMB Peroxidase EIA Substrate Kit (Bio-Rad 社製) で検出し、発色阻害を指標に被験化合物のアグリカナーゼ活性阻害強度を算出した。アグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする基準は、阻害活性強度 ( $IC_{50}$ ) において、好ましくは  $10 \mu M$  以下、さらに好ましくは  $1.0 \mu M$  以下である。

本スクリーニング系により、先に記載した化合物 A、化合物 B、化合物 C 及び化合物 D が選択することができた。アグリカナーゼ活性阻害強度 ( $IC_{50}$ ) は、化合物 A では  $0.6 \mu M$ 、化合物 B では  $1.0 \mu M$ 、化合物 C では  $2.9 \mu M$ 、化合物 D では  $2.7 \mu M$  を示した。

なお、化合物 A、化合物 B、化合物 C 及び化合物 D は先に示した PCT 公開番号 W090/05719 に記載された製造法と同様に合成された。それぞれの化合物のマススペクトルは以下の通りである。化合物 A は  $MS = 426$  ( $MH^+$ )、化合物 B は  $MS = 396$  ( $MH^+$ )、化合物 C は  $MS = 502$  ( $MH^+$ )、化合物 D は  $MS = 440$  ( $MH^+$ )。

#### (実施例 11)

##### (実施例 11-1) ウサギ膝関節軟骨初代培養細胞の調製

ウサギ (日本白色種、オス、 $1.0 \sim 1.5 kg$ ) を過剰麻酔下で致死させた後、膝関節を摘出し、関節表面の軟骨層をメスにて剥離、細断した。さらに、トリプシン-EDTA ( $0.25\% - 1mM$ ; GIBCO-BRL 社製) にて  $37^\circ C$ 、1 時間処理の後、 $1500 rpm$ 、5 分の遠心分離し沈殿を DMEM で洗浄した。続いてコラゲナーゼ A ( $0.15\%$ ; ベーリンガー・マンハイム社製) /DMEM にて  $37^\circ C$ 、3~4 時間処理した後、ナイロン

メッシュフィルター (100  $\mu$  m, Falcon 社製) 通過画分を 1500rpm、5 分の遠心分離にかけ、軟骨細胞を沈殿させた。DMEM/10%FBS 培地で十分に洗浄した後、DMEM/10%FBS 培地に  $2 \times 10^5$  cells/ml になるように懸濁し、I 型コラーゲンをコートした 96 穴プレート (旭テクノグラス社製) に 200  $\mu$  l/穴で蒔いた。3 日後に培地を 50  $\mu$  g/ml アスコルビン酸含有 DMEM/10%FBS 培地 (以下、アスコルビン酸培地) 200  $\mu$  l に交換し、さらに 3 日間培養した。I 型コラーゲンをコートした 6 穴プレート (旭テクノグラス) を用いる場合は、上記細胞懸濁液を 6ml/穴で蒔き、同様に培地交換を行い培養した。これらの細胞を以下の実験に供した。

#### (実施例 11-2) ウサギ膝関節軟骨初代培養細胞のプロテオグリカン分解

実施例 11-1 で示した 96 穴プレートのウサギ膝関節軟骨初代培養細胞を終濃度 10  $\mu$  Ci/ml の  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  含有アスコルビン酸培地 200  $\mu$  l にて 2 日間培養、標識した後、200  $\mu$  l のアスコルビン酸培地で 3 回洗浄し、200  $\mu$  l のアスコルビン酸培地で 1 日間培養した。IL-1  $\beta$  および all-trans レチノイン酸で刺激し、0 時間後、24 時間後、48 時間後の培養上清を 20  $\mu$  l ずつ回収し、トップカウンタ (Packard 社製) を用い、放射活性を計測した。その結果、0.01~10ng/ml の IL-1  $\beta$  で放射活性の上昇、すなわちプロテオグリカンの遊離が認められ、0.1~10  $\mu$  M の all-trans レチノイン酸で濃度依存的かつ強い放射活性の上昇、すなわちプロテオグリカンの遊離が認められた (図 6)。

#### (実施例 11-3) MDS6 mRNA の発現誘導

実施例 11-1 で示した 6 穴プレートのウサギ膝関節軟骨初代培養細胞をアスコルビン培地に交換しさらに 3 日間培養した後、10ng/ml の IL-1  $\beta$  もしくは 10  $\mu$  M の all-trans レチノイン酸を添加し、2 時間後および 6 時間後の total RNA を ISOGEN (ニッポンジーン社製) を用いて添付の指示書に従い調製した。さらに、DNase I 処理 (ニッポンジーン社製) を行い、フェノール/クロロホルム処理後、エタノール沈殿にて回収・精製した total RNA を DEPC 処理した滅菌水に溶解した。ランダムヘキサマーをプライマーとして、この total RNA 1  $\mu$  g を

Thermoscript™ RT-PCR System (GIBCO-BRL 社製カタログ番号 11146-016) を用い、添付の指示書に従い逆転写反応、RNase H 処理を行ったものを滅菌水で 10 倍希釈し、cDNA サンプルとした。この cDNA サンプル各 5  $\mu$  l を鋳型、配列番号 18 および配列番号 19 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、94℃ 2 分の後、94℃ 30 秒、65℃ 30 秒、72℃ 30 秒のサイクルを 45 回、続いて 72℃ 7 分の PCR 反応を行った。反応産物を 2% アガロースにて電気泳動し、生成した DNA 断片の濃さを比較した。その結果、MDTS6 mRNA は IL-1  $\beta$  および all-trans レチノイン酸により発現誘導し、その発現強度は実施例 11-2 におけるプロテオグリカン分解の程度と相関した (図 7)。

(実施例 12) アグリカナーゼ活性を阻害する物質によるウサギ膝関節軟骨初代培養細胞のプロテオグリカン分解抑制

実施例 10-2 のスクリーニング系により選択された化合物 A、化合物 B、化合物 C 及び化合物 D を実施例 11-1 で示したウサギ膝関節軟骨初代培養細胞のプロテオグリカン分解系に 10  $\mu$  M の all-trans レチノイン酸刺激直前に添加し、その抑制作用を検討した。その結果、化合物 A 及び化合物 B は濃度依存的に抑制作用を示した (図 8)。化合物 C 及び化合物 D のプロテオグリカン分解抑制作用 ( $IC_{50}$ ) は、化合物 C は 6.3  $\mu$  M、化合物 D は 4.1  $\mu$  M となった。一方、同じヒドロキサム酸骨格を持つがアグリカナーゼ活性阻害が弱い化合物では 100  $\mu$  M でもプロテオグリカンの分解抑制作用は認められなかった。

(実施例 13) MDTS6 プロモーター領域 DNA 配列の解析

MDTS6 のプロモーター領域に相当する DNA は GenomeWalker DNA Sca I Libraries (genome walker™ Kits, CLONTECH 社カタログ番号 K1803-1) より、PCR 法を用いて増幅した。forward primer としてキット添付のアダプタープライマー AP-1 (配列番号 20)、AP-2 (配列番号 21) のオリゴ DNA を、reverse primer として配列番号 22、配列番号 23 のオリゴ DNA を用いた。具体的な方法はキットの添付説明書通りであるが、PCR には TAKARA LA Taq (TAKARA LA Taq™、カタ



ログ番号 RR002A)を用いた。1回目の PCR 反応はプライマーとして配列番号 20 と配列番号 22 のオリゴ DNA を用い、98℃5 秒、72℃3 分のサイクルを 7 回、98℃5 秒、67℃3 分のサイクルを 32 回、67℃4 分であった。2 回目の反応は 1 回目の反応溶液を TE 緩衝液 (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) を用いて 50 倍希釈したもの 5  $\mu$ l を鋳型、配列番号 21 と配列番号 23 のオリゴ DNA をプライマーとして、上記と同じ条件で行った。増幅された約 3.7 kbp の DNA 断片を直接 dideoxy terminator 法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems Inc) にて配列解析した結果、解読できない 2 ヶ所のギャップで分断された約 2.2 kbp, 0.36 kbp, 0.8 kbp の DNA 配列が明らかになった。

次に、PCR 増幅 DNA 断片の直接解析で解読できなかった 2 カ所のギャップ部の配列を判読するために、この DNA 断片をサブクローニングして、DNA の塩基配列の決定を行った。その結果、該ギャップ部の配列は決定した 8 クローン (配列番号 24、25、26、27、28、29、30 及び 31) で異なり、遺伝子多型の存在が示唆された。なお、クローニングベクターとしては pZErO™-2 vector (Zero Background/ Kan Cloning Kit, Invitrogen 社製、カタログ番号 K2600-01) を用いて、サブクローニングの操作は添付の説明書に従った。

上記 DNA 断片をレポータープラスミド pGV-B2 (東洋インキ社製) の KpnI, XhoI 部位に挿入したプラスミドを FuGene-6 を用い HEK293 細胞に導入し、通常の培養条件で 28 時間または 48 時間培養後のルシフェラーゼ活性を、PicaGene 発色キット (東洋インキ社製、カタログ番号 PGK-L100) を用いて測定した。この際、測定値は同時導入した  $\beta$ -gal 発現プラスミド pCHI10 (アマシャムファルマシア バイオテック社製、カタログ番号 27-4508-01) より発現した  $\beta$ -gal の活性値で補正した。 $\beta$ -gal 活性の測定は Galacto-Light Plus キット (TROPIX 社製、カタログ番号 BL300P) を用いた。その結果、もとのプラスミドである pGV-B2 では認められないルシフェラーゼ活性の明らかな上昇が観察された。このことは上記 DNA 断片中にプロモーター活性が存在することを示している。

(実施例 14) 変形性関節症患者の関節組織での MDS6 発現

変形性関節症患者の疾患部の膝関節軟骨より total RNA を調製し (Adams M. E., et al., Anal. Biochem., 202, 89-95, 1992)、これを鋳型として実施例 11-3 に準じて RT-PCR を行うことにより、MDS6 mRNA の存在を確認した。また、マウス抗ヒト MDS6 特異的ポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色を行い、滑膜組織およびマクロファージに MDS6 蛋白の存在を確認した。

なお、マウス抗ヒト MDS6 特異的ポリクローナル抗体は以下の如く調製した。まず、実施例 6 で調製したヒト MDS6TSP1 蛋白を KLH とコンジュゲートし、マウスに 4-5 回免疫した後、抗血清を調製した。続いて、この抗血清より、Protein G Sepharase 4 Fast Flow (Amasham Pharmacia Biotech 社製) を用い、添付指示書に従い、IgG を調製した。さらに、添付指示書に従い、ヒト MDS6TSP1 蛋白を CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow (Amasham Pharmacia Biotech 社製) に固定したカラムを作製した。このカラムに結合し、対応するヒト ADAMTS4TSP1 蛋白 (aggrecanase-1; Tortorella M. D. et al., Science., 284, 1664-1666, 1999)、METH-1TSP1 蛋白 (Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999)、METH-2TSP1 蛋白 (Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999) を固定したカラムに結合しない分画を調製した。

産業上の利用可能性

本発明で得られた「関節疾患アグリカナーゼ」は、アグリカナーゼ活性を有することより、該アグリカナーゼを有意に阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片）のスクリーニングに用いられることを特徴としている。ここで、該「関節疾患アグリカナーゼ」を有意に阻害する物質の医薬用途としては該アグリカナーゼ活性の亢進、低下、変性等の異常に起因するあるいは該異常を発現・併発する疾患の内、特にプロテオグリカン分解亢進を示す疾患であ

る関節疾患、なかでも変形性関節症の予防・治療に有効であることが示唆される。

さらに、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子は、該遺伝子のプロモーター活性を阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片）をスクリーニングに用いられることを特徴とする。該プロモーター活性を阻害する物質の用途としては、プロモーター活性の阻害に起因する疾患の内、特にプロテオグリカン分解亢進を示す疾患である関節疾患、なかでも変形性関節症の予防・治療に有効であることが示唆される。また、該プロモーター遺伝子には複数の変異体が存在することより、上記疾患との相関解析に用いられる。

## 請求の範囲

1. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物。
2. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物。
3. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 687 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物。
4. 請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物のアミノ酸配列をコードする遺伝子。
5. 請求の範囲 4 に記載の遺伝子を含むベクター。
6. 請求の範囲 5 に記載のベクターを含む宿主細胞。
7. 請求の範囲 6 に記載の宿主細胞を用いることを特徴とする、請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物の製造方法。
8. 請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物に対する抗体。
9. 請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プ

ロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物と被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法。

10. 請求の範囲1乃至3に記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物。

11. 配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31で表される遺伝子、又は該遺伝子の同効物。

## 補正書の請求の範囲

[2001年4月19日(19.04.01)国際事務局受理：出願当初の請求の範囲1-4及び7-11は補正された；他の請求の範囲は変更なし。(2頁)]

1. (補正後) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する、或いは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、アミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ。
2. (補正後) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する、或いは、第1番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、アミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ。
3. (補正後) 配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第687番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第687番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する、或いは、それぞれの配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、アミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ。
4. (補正後) 請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼのアミノ酸配列をコードする遺伝子。
5. 請求の範囲4に記載の遺伝子を含むベクター。
6. 請求の範囲5に記載のベクターを含む宿主細胞。
7. (補正後) 請求の範囲6に記載の宿主細胞を用いることを特徴とする、請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼの製造方法。
8. (補正後) 請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼに対する抗体。
9. (補正後) 請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金

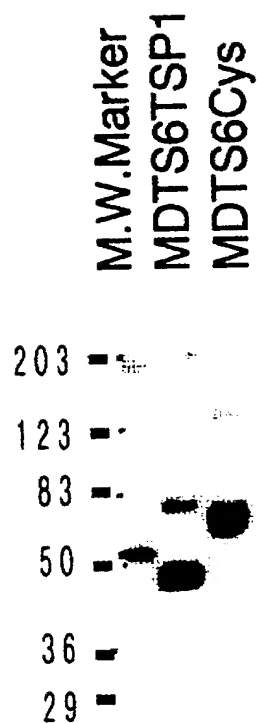
属プロテアーゼと被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法。

10. (補正後) 請求の範囲1乃至3に記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼを阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物。

11. (補正後) 配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31で表される遺伝子、或いは、配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31に記載の塩基配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されていて、かつ、関節疾患アグリカナーゼプロモーター活性を有する遺伝子。

1/8

図 1

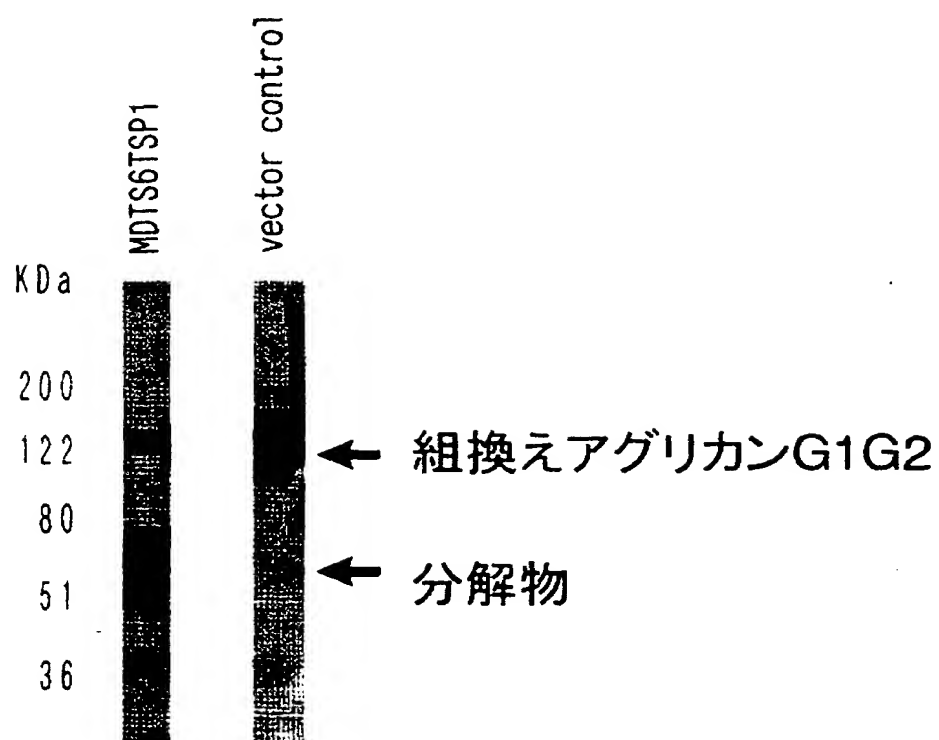


差 替 え 用 紙 (規則26)



2/8

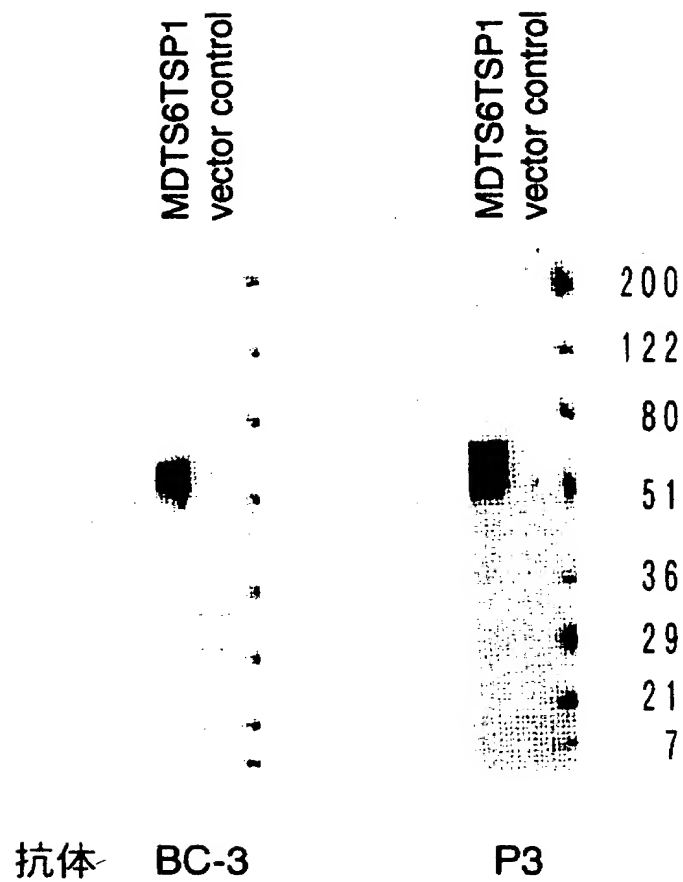
図 2



差替え用紙 (規則26)

3/8

図 3



差替え用紙(規則26)

4/8

図 4

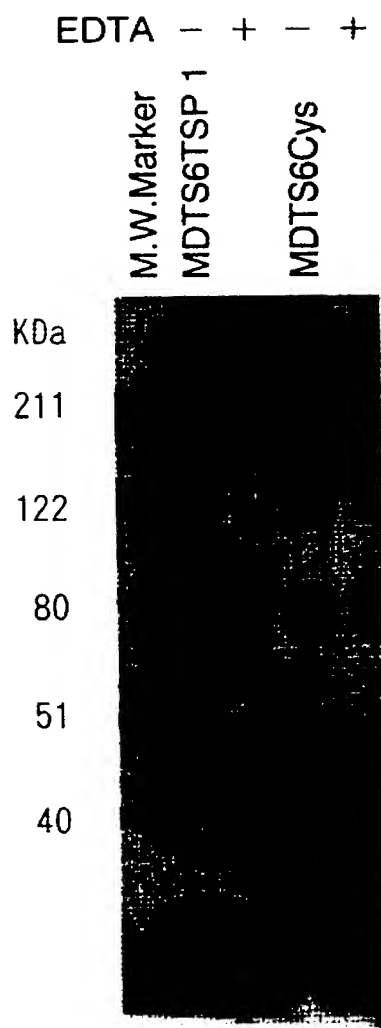
IL-1 処理 (時間) 0 1 2 4 8



差替え用紙 (規則56)

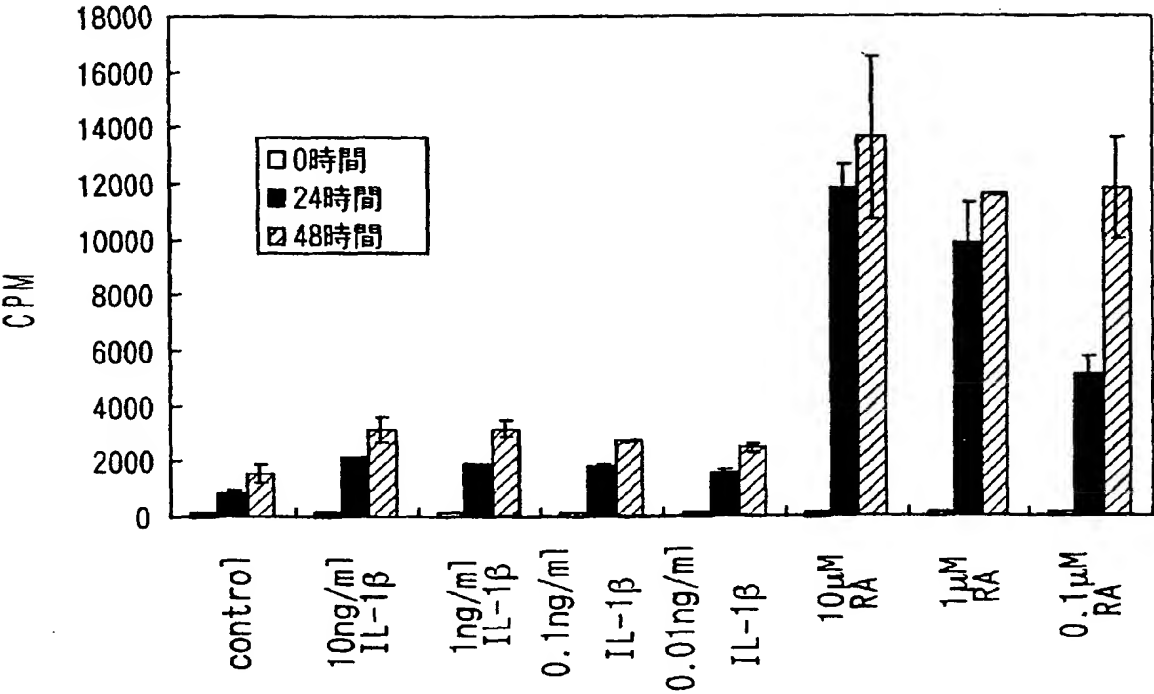
5/8

☒ 5



差替え用紙 (規則26)

図 6



7/8

図 7

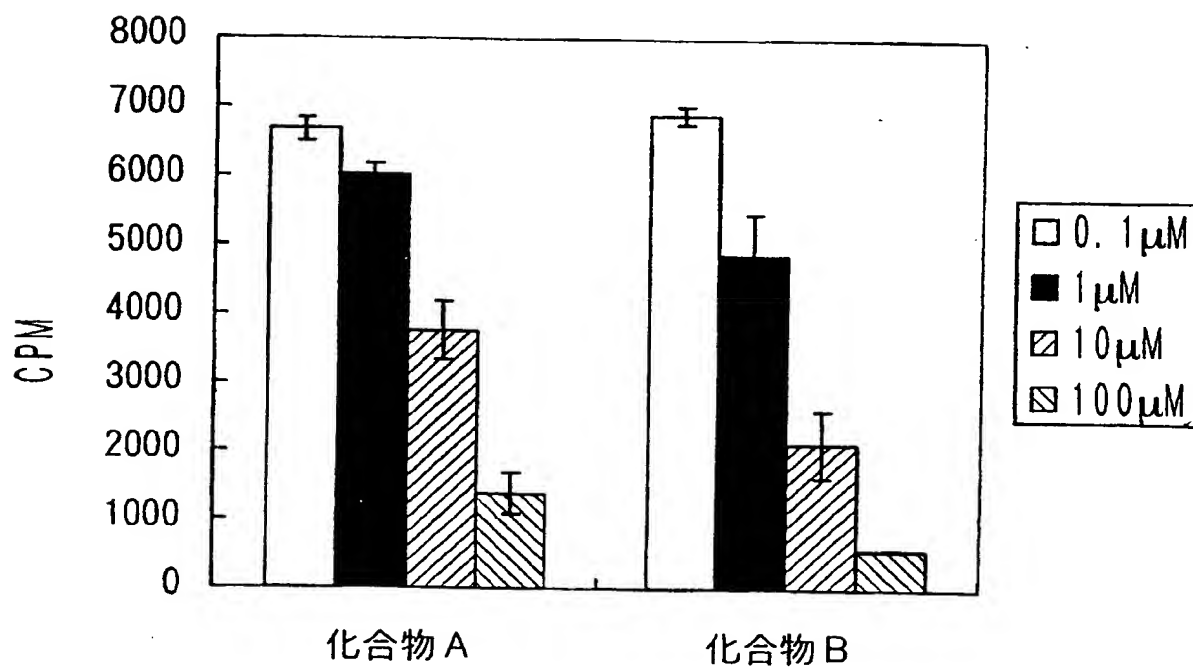
1 2 3 4 5



1: 非処理  
2: IL-1 $\beta$  2時間処理  
3: R.A. 2時間処理  
4: IL-1 $\beta$  6時間処理  
5: R.A. 6時間処理

差替え用紙 (規則26)

図 8



## SEQUENCE LISTING

<110> Kazusa DNA Research Institute

Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Novel metalloprotease having an activity of aggrecanase

<130> YK0029

<140>

<141>

<150>JP 1999-321740

<151>1999-11-11

<150>JP 2000-144020

<151>2000-5-16

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 950

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Leu Leu Gly Ile Leu Thr Leu Ala Phe Ala Gly Arg Thr Ala

1

5

10

15

Gly Gly Phe Glu Pro Glu Arg Glu Val Val Val Pro Ile Arg Leu Asp

20

25

30

Pro Asp Ile Asn Gly Arg Arg Tyr Tyr Trp Arg Gly Pro Glu Asp Ser

35

40

45

Gly Asp Gln Gly Leu Ile Phe Gln Ile Thr Ala Phe Gln Glu Asp Phe

50

55

60



2/27

Tyr Leu His Leu Thr Pro Asp Ala Gln Phe Leu Ala Pro Ala Phe Ser  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Thr Glu His Leu Gly Val Pro Leu Gln Gly Leu Thr Gly Gly Ser Ser  
                                     85                                      90                                      95  
 Asp Leu Arg Arg Cys Phe Tyr Ser Gly Asp Val Asn Ala Glu Pro Asp  
                                     100                                      105                                      110  
 Ser Phe Ala Ala Val Ser Leu Cys Gly Gly Leu Arg Gly Ala Phe Gly  
                                     115                                      120                                      125  
 Tyr Arg Gly Ala Glu Tyr Val Ile Ser Pro Leu Pro Asn Ala Ser Ala  
                                     130                                      135                                      140  
 Pro Ala Ala Gln Arg Asn Ser Gln Gly Ala His Leu Leu Gln Arg Arg  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Gly Val Pro Gly Gly Pro Ser Gly Asp Pro Thr Ser Arg Cys Gly Val  
                                     165                                      170                                      175  
 Ala Ser Gly Trp Asn Pro Ala Ile Leu Arg Ala Leu Asp Pro Tyr Lys  
                                     180                                      185                                      190  
 Pro Arg Arg Ala Gly Phe Gly Glu Ser Arg Ser Arg Arg Arg Ser Gly  
                                     195                                      200                                      205  
 Arg Ala Lys Arg Phe Val Ser Ile Pro Arg Tyr Val Glu Thr Leu Val  
                                     210                                      215                                      220  
 Val Ala Asp Glu Ser Met Val Lys Phe His Gly Ala Asp Leu Glu His  
 225                                      230                                      235                                      240  
 Tyr Leu Leu Thr Leu Leu Ala Thr Ala Ala Arg Leu Tyr Arg His Pro  
                                     245                                      250                                      255  
 Ser Ile Leu Asn Pro Ile Asn Ile Val Val Val Lys Val Leu Leu Leu  
                                     260                                      265                                      270  
 Arg Asp Arg Asp Ser Gly Pro Lys Val Thr Gly Asn Ala Ala Leu Thr  
                                     275                                      280                                      285  
 Leu Arg Asn Phe Cys Ala Trp Gln Lys Lys Leu Asn Lys Val Ser Asp  
                                     290                                      295                                      300  
 Lys His Pro Glu Tyr Trp Asp Thr Ala Ile Leu Phe Thr Arg Gln Asp  
 305                                      310                                      315                                      320  
 Leu Cys Gly Ala Thr Thr Cys Asp Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly  
                                     325                                      330                                      335  
 Thr Met Cys Asp Pro Lys Arg Ser Cys Ser Val Ile Glu Asp Asp Gly  
                                     340                                      345                                      350

3/27

Leu Pro Ser Ala Phe Thr Thr Ala His Glu Leu Gly His Val Phe Asn  
355 360 365  
Met Pro His Asp Asn Val Lys Val Cys Glu Glu Val Phe Gly Lys Leu  
370 375 380  
Arg Ala Asn His Met Met Ser Pro Thr Leu Ile Gln Ile Asp Arg Ala  
385 390 395 400  
Asn Pro Trp Ser Ala Cys Ser Ala Ala Ile Ile Thr Asp Phe Leu Asp  
405 410 415  
Ser Gly His Gly Asp Cys Leu Leu Asp Gln Pro Ser Lys Pro Ile Ser  
420 425 430  
Leu Pro Glu Asp Leu Pro Gly Ala Ser Tyr Thr Leu Ser Gln Gln Cys  
435 440 445  
Glu Leu Ala Phe Gly Val Gly Ser Lys Pro Cys Pro Tyr Met Gln Tyr  
450 455 460  
Cys Thr Lys Leu Trp Cys Thr Gly Lys Ala Lys Gly Gln Met Val Cys  
465 470 475 480  
Gln Thr Arg His Phe Pro Trp Ala Asp Gly Thr Ser Cys Gly Glu Gly  
485 490 495  
Lys Leu Cys Leu Lys Gly Ala Cys Val Glu Arg His Asn Leu Asn Lys  
500 505 510  
His Arg Val Asp Gly Ser Trp Ala Lys Trp Asp Pro Tyr Gly Pro Cys  
515 520 525  
Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Gln Leu Ala Arg Arg Gln Cys Thr  
530 535 540  
Asn Pro Thr Pro Ala Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Val Arg Val  
545 550 555 560  
Lys Tyr Arg Ser Cys Asn Leu Glu Pro Cys Pro Ser Ser Ala Ser Gly  
565 570 575  
Lys Ser Phe Arg Glu Glu Gln Cys Glu Ala Phe Asn Gly Tyr Asn His  
580 585 590  
Ser Thr Asn Arg Leu Thr Leu Ala Val Ala Trp Val Pro Lys Tyr Ser  
595 600 605  
Gly Val Ser Pro Arg Asp Lys Cys Lys Leu Ile Cys Arg Ala Asn Gly  
610 615 620  
Thr Gly Tyr Phe Tyr Val Leu Ala Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Leu  
625 630 635 640

4/27

Cys Ser Pro Asp Ser Thr Ser Val Cys Val Gln Gly Lys Cys Ile Lys  
 645 650 655  
 Ala Gly Cys Asp Gly Asn Leu Gly Ser Lys Lys Arg Phe Asp Lys Cys  
 660 665 670  
 Gly Val Cys Gly Gly Asp Asn Lys Ser Cys Lys Lys Val Thr Gly Leu  
 675 680 685  
 Phe Thr Lys Pro Met His Gly Tyr Asn Phe Val Val Ala Ile Pro Ala  
 690 695 700  
 Gly Ala Ser Ser Ile Asp Ile Arg Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Leu Ile  
 705 710 715 720  
 Gly Asp Asp Asn Tyr Leu Ala Leu Lys Asn Ser Gln Gly Lys Tyr Leu  
 725 730 735  
 Leu Asn Gly His Phe Val Val Ser Ala Val Glu Arg Asp Leu Val Val  
 740 745 750  
 Lys Gly Ser Leu Leu Arg Tyr Ser Gly Thr Gly Thr Ala Val Glu Ser  
 755 760 765  
 Leu Gln Ala Ser Arg Pro Ile Leu Glu Pro Leu Thr Val Glu Val Leu  
 770 775 780  
 Ser Val Gly Lys Met Thr Pro Pro Arg Val Arg Tyr Ser Phe Tyr Leu  
 785 790 795 800  
 Pro Lys Glu Pro Arg Glu Asp Lys Ser Ser His Pro Lys Asp Pro Arg  
 805 810 815  
 Gly Pro Ser Val Leu His Asn Ser Val Leu Ser Leu Ser Asn Gln Val  
 820 825 830  
 Glu Gln Pro Asp Asp Arg Pro Pro Ala Arg Trp Val Ala Gly Ser Trp  
 835 840 845  
 Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Ser Gly Leu Gln Lys Arg Ala Val  
 850 855 860  
 Asp Cys Arg Gly Ser Ala Gly Gln Arg Thr Val Pro Ala Cys Asp Ala  
 865 870 875 880  
 Ala His Arg Pro Val Glu Thr Gln Ala Cys Gly Glu Pro Cys Pro Thr  
 885 890 895  
 Trp Glu Leu Ser Ala Trp Ser Pro Cys Ser Lys Ser Cys Gly Arg Gly  
 900 905 910  
 Phe Gln Arg Arg Ser Leu Lys Cys Val Gly His Gly Gly Arg Leu Leu  
 915 920 925

5/27

Ala Arg Asp Gln Cys Asn Leu His Arg Lys Pro Gln Glu Leu Asp Phe

930

935

940

Cys Val Leu Arg Pro Cys

945

950

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2853

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

atgctttttgc tgggcatcct aaccctggct ttcgccgggc gaaccgctgg aggctttgag 60  
ccagagcggg aggtagtcgt tcccatccga ctggaccggg acattaacgg ccgccgctac 120  
tactggcggg gtcccaggga ctccggggat cagggaactca tttttcagat cacagcattt 180  
caggaggact ttacctaca cctgacgccg gatgctcagt tcttggctcc cgccttctcc 240  
actgagcatt tgggcgtccc cctccagggg ctccaccggg gctcttcaga cctgcgacgc 300  
tgcttctatt ctggggacgt gaacgccgag cgggactcgt tcgctgctgt gagcctgtgc 360  
ggggggctcc gcggagcctt tggctaccga ggccggaggt atgtcattag cccgctgccc 420  
aatgctagcg cggcggcggc gcagcgcaac agccaggggc cacaccttct ccagcgccgg 480  
gggtgttcgg gcgggacctt cggagacccc acctctcgt gcgggggtgg ctcgggctgg 540  
aaccgcccca tctacgggc cctggaccct tacaagccgc ggccggcggg cttcggggag 600  
agtcgtagcc ggccgaggtc tgggcggcgc aagcgtttcg tgtctatccc gcggtacgtg 660  
gagacgctgg tggtcgcgga cgagtcaatg gtcaagttcc acggcgcgga cctggaacat 720  
tatctgtctga cgctgctggc aacggcggcg cgactctacc gccatcccag catcctcaac 780  
cccatcaaca tcgttgtgtt caagggtgct cttcttagag atcgtgactc cgggcccagg 840  
gtcaccggca atgcggccct gacgctgcgc aacttctgtg cctggcagaa gaagctgaac 900  
aaagtgagtg acaagcacc caggtactgg gacactgcca tctcttcac caggcaggac 960  
ctgtgtggag ccaccacctg tgacacctg ggcatggctg atgtgggtac catgtgtgac 1020  
cccaagagaa gctgctctgt cattgaggac gatgggcttc catcagcctt caccactgcc 1080  
cacgagctgg gccacgtgtt caacatgccc catgacaatg tgaaagtctg tgaggagggtg 1140  
tttgggaagc tccgagccaa ccacatgatg tcccggacc tcatccagat cgaccgtgcc 1200  
aacccttgtt cagcctgcag tgcctgcatc atcaccgact tctggacag cgggcacggt 1260  
gactgcctcc tggaccaacc cagcaagccc atctccctgc ccgaggatct gccggcgccc 1320  
agctacacc tgagccagca gtgcgagctg gcttttggcg tgggctccaa gccctgtcct 1380  
tacatgcagt actgcaccaa gctgtggtgc accgggaagg ccaagggaca gatggtgtgc 1440

6/27

```

cagacccgcc acttcccctg ggccgatggc accagctgtg gcgagggcaa gctctgcctc 1500
aaaggggcct gcgtggagag acacaacctc aacaagcaca ggggtggatgg ttcttgggcc 1560
aaatgggata cctatggccc ctgctcgccg acatgtgggt ggggcgtgca gctggccagg 1620
aggcagtgc ccaacccccac ccttgccaac gggggcaagt actgcgaggg agtgaggggtg 1680
aaataccgat cctgcaacct ggagccctgc cccagctcag cctccgaaa gagcttccgg 1740
gaggagcagt gtgaggcttt caacggctac aaccacagca ccaaccggct cactctcgcc 1800
gtggcatggg tgcccaagta ctccggcgtg tctccccggg acaagtgcga gctcatctgc 1860
cgagccaatg gcactggcta ctctatgtg ctggcaccca aggtgggtgga cggcacgctg 1920
tgctctcctg actccacctc cgtctgtgtc caaggcaagt gcatcaaggc tggctgtgat 1980
gggaaccttg gctccaagaa gagattcgac aagtgtgggg tgtgtggggg agacaataag 2040
agctgcaaga aggtgactgg actcttcacc aagcccatgc atggctacaa ttctgtgtg 2100
gccatccccg caggcgccctc aagcatcgac atccgccagc gcggttacia agggctgata 2160
gggatgaca actacctggc tctgaagaac agccaaggca agtacctgct caacgggcat 2220
ttctgtgtgt cggcgggtga gcgggacctg gtggtgaagg gcagtctgct gcggtacagc 2280
ggcacgggca cagcgggtga gagcctgcag gcttcccgcc ccatcctgga gccgctgacc 2340
gtggagggtc tctccgtggg gaagatgaca ccgccccggg tccgtactc ctctatctg 2400
cccaaagagc ctggggagga caagtcctct catcccaagg acccccgggg accctctgtc 2460
ttgcacaaca gcgtcctcag cctctccaac cagggtggagc agccggacga caggccccct 2520
gcacgctggg tggctggcag ctggggggccg tgctccgga gctgcggcag tggcctgcag 2580
aagcggggcg tggactgccg gggctccgcc gggcagcgca cggtccttgc ctgtgatgca 2640
gccccatcgg ccgtggagac acaagcctgc ggggagccct gccccacctg ggagctcagc 2700
gcctggtcac cctgctccaa gagctgcggc cggggatttc agaggcgctc actcaagtgt 2760
gtggggccag gaggccggct gctggcccgg gaccagtgc acttgcaccg caagccccag 2820
gagctggact tctgcgtcct gaggccgtgc tga 2853

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

```

ctagcgcggc cgcaggatcc gactacaagg acgacgatga caaatgataa 50

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 50

7/27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

gatcttatca tttgtcatcg tcgtccttgt agtcggatcc tgcggccgcg 50

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

ggactagtct agaagctggg taccagctgc tagc 34

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

ggactagtgt cgaccgggtca tggctgcgc 29

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

gtgtctagag ccatgctttt gctgggcatc ctaaccctgg ct 42

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

8/27

agagcggccg cctgctcctc ccggaagctc ttccggagg c 41

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

aagcacaggg tggatggttc ctgggcc 27

<210> 10

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gcgcggccgc gcacggcctc aggacgcaga agtccag 37

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

taggatcctt gtagaaactt cagacatga caactcg 37

<210> 12

<211> 59

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

atggatcctc aatggtgatg gtagatgatga ccgaagcaga aggcattgtg ccgggacag 59

<210> 13

<211> 97

9/27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 13

agcttgccac catgaagacg atcatcgccc tgagctacat cttctgccctg gtattcgccg 60  
actacaagga cgatgatgac aaggggatcc actagtc 97

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 97

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 14

tcgagactag tggatcccct tgtcatcatc gtcctttag tggcggaata ccaggcagaa 60  
gatgtagctc agggcgatga tcgtcttcac ggtggca 97

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 15

acctcagcag ccagctccct tgtatacaca 30

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 16

cttgaggggg atggaccaat acagctttgg 30

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens



10/27

&lt;400&gt; 17

agagcggccg ctccagtcac cttcttgacg ctcttatt

38

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 18

gcggacgagt ccatgggtcaa gttccac

27

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 19

ttctgccagg cgcagaagtt gcgcagc

27

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 20

gtaatacgac tcactatagg gc

22

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 21

actatagggc acgcgtggt

19

11/27

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 22

actgagcatc cggcgtcagg ttaggtaaa

30

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 23

agtcctcctg aaatgctgtg atctgaaaaa

30

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 3473

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt;

&lt;400&gt; 24

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgacatc gggctctaaa 60  
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatct gacctggctc 120  
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240  
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgt caacatatcc ctatgacctc 300  
aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360  
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420  
atacatgcta atcccttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480  
tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540  
ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600

12/27

taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660  
tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttggttg tctgcgtttc tctttaatta 720  
taggccctct ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact cctgtctca 780  
cacacagtcc tcccatatcc atacacatct tticatttgc agagtataaa caccatctc 840  
tcactcattc acataatgaa tticagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900  
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960  
ggatccttta tggggagaag ataatgggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020  
agccttttct ctcttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc ctaaaaaaa 1080  
attccaaaat tctcccatat catccctttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140  
tgtctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200  
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctcttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260  
aagttagatt tgcggagagg taagaaggat cttaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320  
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380  
cactcggcct cctatgccag tccccagtcc agggtttggc caagggtcaa atgagataat 1440  
ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500  
tgtaaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
gggtcatct tctgcccc aacccagct ctgatttgct tattcagggtg gtgtaaatac 1620  
ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680  
acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactctttc tgggagttgc 1740  
tgtctcagag ggttggcggc tctggtggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
gaagcgacgg gttttagta ttattacct tttaaaaatg tactttgttg ctaggcatgg 1860  
tggtcaccgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgagggt ggtggattgc ttgagctcag 1920  
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctaccaaaa atacacacac 1980  
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acacacaaat tggcctagcg 2040  
tggtgtcgtg tgtctgtgtg cgcagttact caggagacca aggtaggagg taggaaacca 2100  
aggtaggagg atcaccggag gtcggtagtt cgagaccagc ctgaccaaca tggagaaacc 2160  
ctgtctttac taaaaataca aaattagctg ggcgtggttg tgcatgcctg taattccagc 2220  
tacttgggag gctgagacag gagaatggct tgaaccggga aggcggagtt tgcggtgagc 2280  
tgagatcgcg tcattgcact ccagcctggg caacaagagc aaaactccgt ctcaaaaaaa 2340  
aagaaatata tatatatatg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtatgtata tatatatatg 2400  
tatgtgtata tatatgtatg tgtgtgtgtg tgcatatata tatatacact ttgtttaatt 2460  
gtaagtgtgt ttagtttaatt tttaataat gtccgtgatt aacagctggc tggcaagatt 2520  
cctgagaact gaagagtttg cccagccca tccagcacac catgggcca gggcagacct 2580  
tggggctagg cgtcttggg ttccagaggg ctcccatgcc cctgtcctat tgctcttctg 2640  
gcaataggac atttacgagg gggggggggg tggttcttga ttctgggtct tttaggggac 2700  
tctgtgatta agaaacagca gggatgttgc aacagcaggg atgaggtggg cctggggagc 2760

```

ggtcagtgaagggtcttcat tccatagctgc tgacctgac tgccttgaga taaaagacta 2820
agaccagag agtgaacgct gtccgcgggg gcagaagcga gtgaggcgctc gggacagtgg 2880
ggcataacca agagcaaaac gcaaaactgag acttcagcgc cggtttctcg ggccagccca 2940
cgctctctgc ctacgtcaa tgccactccc tccccgcaa gtggctctcc gctctggagg 3000
cgggaccgag ttctccggtg gcccctggag gctccggcag cgagctctgg gaggctggga 3060
ggggagttaggggagggcg ctgactgggc cgtccaaaga ggagggggcc tttaataggc 3120
tcgcccagcg cctggcttgc tgcgctgcga gtggctgcgg ttgcgagaag ccgcccggca 3180
ccttccgcta gttctcggct gcaaatcttc gtccttgac ttgacagcga ttgtacttaa 3240
gctcccaggc cgcgcttgc ttggaaaggc acaggtagga agcgcgggct gccgggtgca 3300
cgctcgccgc cctgggagga gtctccctcc ctgggctctc ctttctggga actgccggct 3360
gtcccgtagc gttggcggtt ccagagtgcg ggctgcacgg agaccgcggc agcgccgga 3420
gagcccgcc cagcccttc ccacagcgc gcggtgcgt gcccgccgc atg 3473

```

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 3467

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt;

&lt;400&gt; 25

```

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatit gacctggctc 120
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgt caacatatcc ctgactctc 300
aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
ttaaatagca gaatgcacat ataactcttg gtgcaatggt tagcacatac taagcctgca 420
ataatgcta atcccttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480
tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540
ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc ctggccaaaa ccatgggtc agaataaaag 600
taaagtgcg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
tgcttgcccc aaataaatga cttatcatig ctgttggttg tctgcgttct tctttaatta 720
taggccctct ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact ccctgtctca 780

```

cacacagttc tcccatatccc atacactctc ttctatttgc agagtataaa caccatctc 840  
tcaatcattc acataatgaa ttctagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900  
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960  
ggatccttta tggggagaag ataattgggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020  
agccttttct ctccttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080  
attccaaaat tctcccacat catccccttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140  
tgtctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200  
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctccttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260  
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320  
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380  
cactcggcct cctatgccag tccccagtc agggtttggc caagggtcaa atgagataat 1440  
ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500  
tgtaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
gggctcatct tcctgcccc aaccccagct ctgatttgc taticagggt gtgtaaatac 1620  
ttctaccagg acctatttca agccatttg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680  
acaccattta atatttccct cacatttcca ccccatctg cactcttttc tgggagttgc 1740  
tgtctcagag ggttggcggc tctggtggc caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
gaagcgacgg gttttgagta ttattacct tttaaaaatg tactttgttg ctaggcatgg 1860  
tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgaggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920  
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980  
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac aaattggcct agcgtggtgt 2040  
cgtgtgtctg tggctgcagt tactcaggag accaaggtag gaggtaggaa accaaggtag 2100  
gaggatcacc cgaggctcgt agttcgagac cagcctgacc aacatggaga aaccctgtct 2160  
ttactaaaaa tacaaaatta gctgggcgtg gtggtgcatg cctgtaattc cagctacttg 2220  
ggaggctgag acaggagaat ggcttgaacc cggaaggcgg agtttgcggg gagctgagat 2280  
cgcgtcattg cactccagcc tgggcaacaa gagcaaaact ccgtctcaa aaaaaagaaa 2340  
tatatatata tatgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtatg tatatatata tatgtatgtg 2400  
tatatatatg tatgtgtgtg tgtgtgcata tatatatata cactttgttt aattgtaagt 2460  
gtgtttagtt taatttttaa taatgtccgt gattaacagc tggctggcaa gattcctgag 2520  
aactgaagag ttgtccccag cccatccagc acaccatggg cccagggcag accttggggc 2580  
taggcggtct tgggttccag agggctccca tgccttctc ctattgctct tctggcaata 2640  
ggacatttac gggggggggg ggggtggttc ttgattctgg gtccttttagg ggactctgtg 2700  
attaagaaac agcagggatg ttgcaacagc agggatgagg tgggcctggg gacgggtcag 2760  
tgaagggtct tcattcctag ctgctgacct gatctgccct gagataaaag actaagaccc 2820  
agagagtga cgtgtctcgc gggggcagaa gcgagtgagg cgtcgggaca gtggggcata 2880  
accaagagca aaacgcaaac tgagacttca gcgccggttt ctggggccag cccacgcctc 2940

```

ctgcctcagc tcaatgccac tccctccccg ccaagtggct ctccgctctg gaggcgggac 3000
cgagtcttcc ggtggccctt ggaggctccg gcagcgagct ctgggaggct gggaggggag 3060
tgaggggagg ggcgctgact gggccgtcca aagaggaggg ggccctttaa aggctcgccc 3120
agcgcttggc ttgctgcgtt gcgagtggct gcggttgcga gaagccgccc ggcaccttcc 3180
gctagtcttc ggctgcaaat ctctgtcctt gcacttgaca gcgattgtac ttaagctccc 3240
agggcgcgct ttgcttgaa aggcacaggt aggaagcgcg ggctgccggg tgcacgctcg 3300
ccgccctggg aggagtctcc ctcccttggc tctcctttct gggaactgcc ggctgtcccc 3360
tagcgttggc ggttccagag tgcgggctgc acggagaccg cggcagcggc cggagagccc 3420
ggcccagccc ctccacag cgcgcggtg cgctgcccg cgccatg 3467

```

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 3464

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt;

&lt;400&gt; 26

```

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtc tgtaatatit gacctggctc 120
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgt caacatatcc ctagatcctc 300
aatcccttg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
ttaaatagca gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgti tagcacatac taagcctgca 420
atacatgcta atccctttga gcaaatccac atggccagti tctgtgtca ggggtgagaa 480
tagctgggct gtgattggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540
ccctgccatc ttgactgaca tgcctgcagc cttgccaaaa cccatgggtc agaataaag 600
taaagtgcg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
tgcttgcccc aaataaatga ctatcattg ctgttgggtg tctgcgtttc tctttaatta 720
taggccctct ttgaacgtc aaacacacag ggcccttgta agcttgaact cctgtctca 780
cacacagtcc tccataccc atacactctc ttcatattgc agagtataaa caccatctc 840
tcactcattc acataatgaa tticagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggccctactg 900
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960

```

ggatccttta tggggagaag ataatgggca aaaagtgtc ttcactgatg gaccagtccc 1020  
agccttttct ctccttggac aatagagttc ttcctttgaa cagccacttc cctaaaaaaaa 1080  
attccaaaat tctcccacat catccccttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140  
tgtctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200  
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctccttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260  
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttagaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320  
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380  
cactcggcct cctatgccag tccccagtcc agggtttggg caagggtcaa atgagataat 1440  
ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctctt 1500  
tgtactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
gggctcatct tcctgcccc aaccccagct ctgatttgct tattcagggtg gtgtaaatac 1620  
ttctaccagg acctatttca agccatttg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680  
acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740  
tgtctcagag ggttggcggg tctgggtggc caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
gaagcgacgg gttttgagta ttattacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcatgg 1860  
tggtcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgaggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920  
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980  
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacaa attggcctag cgtgggtgtc 2040  
tgtgtctgtg gtgcgagta ctccaggagac caaggtagga ggtaggaaac caaggtagga 2100  
ggatcacccg aggtcggtag ttccagacca gccagacca catggagaaa cctgtcttt 2160  
actaaaaata caaaattagc tgggcgtggg ggtgcatgcc tgtaattcca gctacttggg 2220  
aggctgagac aggagaatgg ctggaaccg gaaggcggag ttgcggtga gctgagatcg 2280  
cgtcattgca ctccagcctg ggcaacaaga gcaaaactcc gtctcaaaaa aaaagaaata 2340  
tatatatata tatgtgtgtg tigtgtgtg tigtgtatg tatatatata tatgtatgtg 2400  
tatatatatg tatgtgtgtg tigtgtcata tatatataca cttgttttaa ttgtaagtgt 2460  
gtttagttta atttttaata atgtccgtga ttaacagctg gctggcaaga ttcttgagaa 2520  
ctgaagaggt tgcctcagcc catccagcac accatgggcc cagggcagac ctgggggcta 2580  
ggcggctctg ggttccagag ggctcccatg cccctgtcct attgctcttc tggcaatagg 2640  
acatttacgc gggggggggg gtggttcttg attctgggtc ttttagggga ctctgtgatt 2700  
aagaaacagc agggatgttg caacagcagg gatgagggtg gcctggggac gggtcagtga 2760  
agggtcttca ttcttagctg ctgacctgat ctgccctgag ataaaagact aagaccaga 2820  
gagtgaaacg tgtccgcggg ggcagaagcg agtgaggcgt cgggacagtg gggcataacc 2880  
aagagcaaaa cgcaaaactga gacttcagcg ccggtttctc ggccagccc acgcctcctg 2940  
cctcagctca atgccactcc ctcccgcga agtggtctc cgctctggag gcgggaccga 3000  
gttctccgtt gggccctgga ggctccggca gcgagctctg ggaggctggg aggggagtga 3060  
ggggaggggc gctgactggg ccgtccaaag agggaggggc ctttaatagg ctgcgccagc 3120

17/27

gcctggcttg ctgcgctgcg agtggctgcg gttgcgagaa gccgcccggc accttccgct 3180  
 agttctcggc tgcaaatctt cgtccttgca cttgacagcg attgtactta agctcccagg 3240  
 gcgcgctttg cttggaaaagg cacaggtagg aagcgcgggc tgccgggtgc acgctcgccg 3300  
 ccctgggagg agtctccctc ccttggctct ctttcttggg aactgccggc tgtcccgtag 3360  
 cgttggcggg tccagagtgc gggctgcacg gagaccggc cagcggccgg agagcccggc 3420  
 ccagccctt cccacagcgc ggcgggtgcg tgcccggcgc catg 3464

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 3469

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt;

&lt;400&gt; 27

ttgcacagct aagatctggg ggaggcatgc acacagggcc ctctgacat gggctctaaa 60  
 tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatat ttgaccttgc 120  
 ttatcttagg tattaatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
 gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240  
 gtggagtgc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgc caacatatcc ctagatcctc 300  
 aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360  
 ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagccgtga 420  
 atacatgcta atccctttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgtcga ggggtgagaa 480  
 tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540  
 ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc cttgccaaaa cccatgggtc agaataaag 600  
 taaagtgcg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660  
 tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttgggtg tctgcgtttc tctttaattt 720  
 taggcctctt ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact cctgtgtcga 780  
 cacacagtcc tcccatacc atacactctc ttctatttgc agagtataaa caccatctc 840  
 tcactcattc acataatgaa ttacagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900  
 gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960  
 ggatccctta tggggagaag ataattgggca aaaagtgtct ttacatgatg gaccagtccc 1020  
 agccttttct ctcttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080  
 attccaaaat tctcccatat catccctttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140



tgtcctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200  
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctccctgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260  
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320  
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380  
cactcggcct cctatgccag tccccagtc agggtttggg caagggtcaa atgagataat 1440  
ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500  
tgtaactgca gcccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
gggctcatct tctgcccc aaccccagct ctgatttgct tattcagggtg gtgtaaatac 1620  
ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680  
acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740  
tgtctcagag ggttggcggg tctgggtggc caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
gaagcgacgg gttttgagta ttattacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcatgg 1860  
tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgagggt ggtggattgc ttgagctcag 1920  
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980  
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acaaattggc ctagcgtggg 2040  
gtcgtgtgtc tgtgttcgca gttactcagg agaccaagggt aggaggtagg aaaccaagggt 2100  
aggaggatca cccgaggctg gtagttcgag accagcctga ccaacatgga gaaaccctgt 2160  
ctttactaaa aatacaaaat tagctgggcg tgggtgtgca tgcctgtaat tccagctact 2220  
tgggaggctg agacaggaga atggcttgaa cccggaaggc ggagtttgcg gtgagctgag 2280  
atcgcgtcat tgcactccag cctgggcaac aagagcaaaa ctccgtctca aaaaaaaga 2340  
aatatatata tatatgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgta tgtatatata tatatgtatg 2400  
tgtatatata tgtatgtgtg tgtgtgtgca tatatatata tacactttgt ttaattgtaa 2460  
gtgtgtttag ttttaatttt aataatgtcc gtgatttaaca gctggctggc aagattcctg 2520  
agaactgaag agtttgcctc agcccatcca gcacaccatg ggcccagggc agaccctggg 2580  
gctaggcggt ctgggttcc agagggtcc catgcccctg tcctattgct ctcttgcaa 2640  
taggacattt acgcgggggg ggggggtggg tcttgattct gggtctttta ggggactctg 2700  
tgattaaaga acagcaggga tgttgcaaca gcagggatga ggtgggcctg gggacgggtc 2760  
agtgaagggt cttcatctct agctgctgac ctgatctgcc ctgagataaa agactaagac 2820  
ccagagagtg aacgctgtcc gcgggggcag aagcgagtga ggctcggga cagtggggca 2880  
taaccaagag caaacgcaa actgagactt cagcgccggt ttctcgggcc agcccacgcc 2940  
tctgcctca gctcaatgcc actccctccc cgccaagtgg ctctccgctc tggaggcggg 3000  
accgatttct ccggtggccc ctggaggctc cggcagcgag ctctgggagg ctgggagggg 3060  
agtgaaggga ggggcgtga ctgggccgtc caaagaggag ggggccttta ataggctcgc 3120  
ccagcgcttg gcttgctgcg ctgcgagtgg ctgcggttgc gagaagccgc ccggcacctt 3180  
ccgctagttc tcggctgcaa atcttctgcc ttgcattga cagcgattgt acttaagctc 3240  
ccagggcgcg ctttgcttgg aaaggcacag gtaggaagcg cgggctgccg ggtgcacgct 3300

19/27

cgccgcccctg ggaggagtct cctcccttg gctctccttt ctgggaactg ccggctgtcc 3360  
cgtagcgttg gcggttccag agtgcgggct gcacggagac gcgggcagcg gccggagagc 3420  
ccggcccagc ccttccac agcgcgcggtg tgcgtgccc ggcgccaig 3469

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 3470

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt;

&lt;400&gt; 28

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgacat gggctctaaa 60  
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatit gacctggctg 120  
ttaatcttagg taattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
gagctaggat accccttctc ttgtgacaga cgagtcagag aatcagatca gtgatagaag 240  
tggagtgccat atcctgagta tcacctctac tcaagtgtc aacatatccc tagatcctca 300  
attccctggc aaaagtgtat ggatggaacc acaggcttcc aagaggggac agtcaagcat 360  
taaatacgag aatgcacata taactcttgg tgcaatgttt agcacatact aagcctgcaa 420  
tacatgctaa tccctttgag caaatccaca tggccagitt ctgtgtctag ggggtgagaat 480  
agctgggctg tgattggggc agggggagca ctaagtggga gggacttctt gtctcaggtc 540  
cctgccatct tgactgacat gctgcagccc ttgccaaaac ccatgggtca gaatgaaagt 600  
aaagtgccgt tgaaaacctt gcaatccacc tttaaaactg ccgggtgtag taaaacaatt 660  
gcttgcccca aataaatgac ttatcattgc tgttggttgt ctgcgtttct ctttaattat 720  
aggccctctt tgaacgtca aacacacagg gcctttgtaa gcttgaactc cctgtctcac 780  
acacagtcct ccataacca tacactctct ttcatattga gagtataaac acccatctct 840  
cactcattca cataatgaat ttcagctcct tgtgtcccaa tcaaggagag gcctcactgg 900  
aattatgggc atctgagcca tcttcattgt ccaaggcccc agggggcgct tccaagagt 960  
gatcctttat ggggagaaga taatgggcaa aaagtgtct tcaatgatgg accagtccca 1020  
gccttttctc tccttggaac atagagtctt tcccttgaa agccacttcc ctaaaaaaaa 1080  
ttccaaaatt ctccacatc atcccttta tgccttaaat catcacacac tcccttcttt 1140  
gtcctccctt ctgcaaaact caactcagag cctttggct ccagaaagat ttcttaggta 1200  
tcaggagaga gtagcaaagc ctccctctc tccttgctt tctcccttgt cagagaaaga 1260  
agtgtattct gcggagaggt aagaaggatc ttgaggtcta gagcctgaaa aactccttgg 1320

gctgttctcc aaactagatg ggaacataag gtgcgattgc atcttctcca gctgatactc 1380  
actcggcctc ctatgccagt cccaggtcca gggtttggtc aagggtcaaa tgagataatt 1440  
tcatggagga agcctggccc gatttttcta ctgtttgctg gaagacagcc tcttctcttt 1500  
gtaactgcag cccagaacc tgatctccac atccctgcc aagcaggtagc tgtgtacaag 1560  
ggctcatctt cctgccccca acccagctc tgatttgctt attcaggtgg tgaataact 1620  
tctaccagga cctatttcaa gccattgtga tgtccctgac tggggagatg cagggcagca 1680  
caccatttaa tatttccctc acatttccac cccattctgc actcttttct gggagttgct 1740  
gtctcagagg gttggcggtt ctggtggctc aagaccataa gtaattatca aatacttagg 1800  
aagcgacggg ttttgagtat ttattacctt ttaaaaatgt actttgtggc taggcatggt 1860  
ggctcacgcc tgtagtcccc gcaccgggag gccgaggtgg gtggattgct tgagctcagg 1920  
agttcaagac cagcctgggc aacacggcga aaccagctt ctacaaaaa tacacacaca 1980  
cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca caaattggcc tagcgtgggtg 2040  
tcgtgtgtct gtggtcgag ttactcagga gaccaaggta ggaggtagga aaccaaggta 2100  
ggaggatcac ccgaggtcgg tagttcgaga ccagcctgac caacatggag aaacctgtc 2160  
tttactaaaa atacaaaatt agctgggcgt ggtggtgcat gcctgtaatt ccagctactt 2220  
gggaggctga gacaggagaa tggcttgaac ccggaaggcg gagtttgagg tgagctgaga 2280  
tcggtcatt gcactccagc ctgggcaaca agagcaaac tccgtctcaa aaaaaagaa 2340  
atatatatat atagtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtat gtatatatat atagtatgt 2400  
gtatatatat gtatgtgtgt gtgtgtgcat atatatatat acactttgtt taattgtaag 2460  
tgtgtttagt ttaattttta ataattgtccg tgattaacag ctggctggca agattcctga 2520  
gaactgaaga gtttgcctca gccatccag cacaccatgg gccagggca gacctgggg 2580  
ctaggcggtc ttgggttcca gagggtccc atgcccctgt cctattgtc tctggcaat 2640  
aggacattta cgcggggggg gggggggtgg ttcttgattc tgggtctttt aggggactct 2700  
gtgattaaga aacagcaggg atgttgcaac agcagggatg aggtgggcct ggggacgggt 2760  
cagtgaaggg tcttcatcc tagctgtga cctgatctgc cctgagataa aagactaaga 2820  
cccagagagt gaacgtgtc cgcgggggca gaagcgagt aggcgtcggg acagtggggc 2880  
ataaccaaga gcaaacgca aactgagact tcagcgccgg ttctcgggc cagcccacgc 2940  
ctcctgcctc agctcaatgc cactccctcc ccgccaagt gctctccgt ctggaggcgg 3000  
gaccgagttc tccggtggcc cctggaggct ccggcagcga gctctgggag gctgggagg 3060  
gagtgagggg aggggcgctg actgggccgt ccaaagagga gggggcctt aataggctcg 3120  
cccagcgctt ggcttgctgc gctgcgagt gctgcggtt cgagaagccg cccggcacct 3180  
tccgctagtt ctgggtgca aatcttcgtc ctgacattg acagcgattg tacttaagct 3240  
cccagggcgc gctttgctg gaaaggcaca ggtaggaagc gcgggtgcc ggggtcacgc 3300  
tcgccgccct gggaggagtc tccctccctt ggctctcctt tctgggaact gccggctgtc 3360  
ccgtagcggtt ggcgggtcca gagtgcgggc tgcacggaga ccgcggcagc gggcgagag 3420  
ccgggccag ccccttcca cagcgggcg gtgcgtgcc cggcgccatg 3470

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 3467

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt;

&lt;400&gt; 29

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60  
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaataatt gacctggctg 120  
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240  
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgt caacataatcc ctagatcctc 300  
aatcccttgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360  
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420  
atacatgcta atccctttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgtcta ggggtgagaa 480  
tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540  
ccctgccatc ttgactgaca tgcctgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600  
taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660  
tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttgggtg tctgcgtttc tctttaatta 720  
taggccctct ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact ccctgtctca 780  
cacacagtcc tcccatatcc atacactctc ttcatattgc agagtataaa caccatctc 840  
tcactcattc acataatgaa ttccagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900  
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960  
ggatccttta tggggagaag ataatgggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020  
agccttttct ctcttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaaa 1080  
attccaaaat tctccacat catcccttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140  
tgtctcccc tcttgcaaac tcaatcaga gcccttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200  
atcaggagag agtagcaaag cctccctct ctcttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260  
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttgaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320  
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380  
cactcggcct cctatgccag tccccagtc agggtttgg caagggtcaa atgagataat 1440  
ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgt ggaagacagc ctcttctct 1500

tgtaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
gggctcatct tcctgcccc aacccagct ctgatttgct taticagggtg gtgtaaatac 1620  
ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680  
acaccattta atatttccct cacatttcca cccatttctg cactcttttc tgggagttgc 1740  
tgtctcagag ggttggcggt tctggtggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
gaagcgacgg gttttgagta ttatttacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcatgg 1860  
tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgagggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920  
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980  
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acaaattggc cttagcgtggt 2040  
gtcgtgtgtc tgtggtcgca gttactcagg agaccaaggt aggaggtagg aaaccaaggt 2100  
aggaggatca cccgaggtcg gtagttcgag accagcctga ccaacatgga gaaaccctgt 2160  
ctttactaaa aatacaaaa tagctggcg tgggtggtgca tgcctgtaat tccagctact 2220  
tgggaggctg agacaggaga atggcttgaa cccggaaggc ggagtttgcg gtgagctgag 2280  
atcgctcat tgcactccag cctgggcaac aagagcaaaa ctccgtctca aaaaaaaga 2340  
aatatatata tatatgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatgtatata tatatatgta 2400  
tgtgtatata tatgtatgtg tgtgtgtgtg catatatata tacactttgt ttaattgtaa 2460  
gtgtgtttag tttattttt aataatgtcc gtgattaaca gctggctggc aagattcctg 2520  
agaactgaag agtttgcccc agcccatcca gcacaccatg ggcccagggc agaccttggg 2580  
gctaggcggt ctggggttcc agagggtcc catgcccctg tcctattgct cttctggcaa 2640  
taggacattt acgcgggggg ggggtggttc ttgattctgg gtcttttagg ggactctgtg 2700  
attaagaaac agcagggatg ttgcaacagc agggatgagg tgggcctggg gacgggtcag 2760  
tgaagggtct tcatcctag ctgctgacct gatctgccct gagataaaaag actaagaccc 2820  
agagagtga cgcgtccgc gggggcagaa gcgagtgagg cgtcgggaca gtggggcata 2880  
accaagagca aaacgcaaac tgagacttca gcgccggttt ctccggccag cccacgcctc 2940  
ctgcctcagc tcaatgccac tccctccccg ccaagtggct ctccgtctg gaggcgggac 3000  
cgagttctcc ggtggccctt ggaggctccg gcagcgagct ctgggaggct gggaggggag 3060  
tgaggggagg ggcgtgact gggccgtcca aagaggaggg ggcctttaat aggcctgccc 3120  
agcgcttggc ttgctgctt gcgagtggct gcggttgca gaagccgccc ggcaccttcc 3180  
gctagtcttc ggctgcaaat cttcgtcctt gcacttgaca gcgattgtac ttaagctccc 3240  
agggcgctt ttgcttgaa aggcacaggt aggaagcgcg ggctgccggg tgcacgtcgc 3300  
ccgccctggg aggagtctcc ctcccttggc tctcctttct gggaactgcc ggctgtcccg 3360  
tagcgttggc ggttccagag tgcgggctgc acggagaccg cggcagcggc cggagagccc 3420  
ggcccagccc ctccccacag cgcggcggtg cgctgcccgg cgccatg 3467

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 3462

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt;

&lt;400&gt; 30

```
ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgacat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatit gacctggctc 120
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagctaggat aacccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgt caacatatcc ctagatcctc 300
aatccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagaggga cagtcaagca 360
ttaaatcaga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420
atacatgcta atcccttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480
tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540
ccctgccatc ttgactgaca tgcctgcagcc ctggccaaaa ccatgggtc agaataaaag 600
taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
tgcttgcccc aaataaatga cttatcatig ctgttggttg tctgcgtttc tctttaatta 720
taggccccct ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact cctgtctca 780
cacacagtc tcccatacc atacactctc ttcatattgc agagtataaa caccatctc 840
tcactcattc acataatgaa ttccagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggctcactg 900
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
ggatccttta tggggagaag ataatgggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020
agccttttct ctcttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
attccaaaat tctccacat catcccttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140
tgtctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gcccttggc tccagaaaga tttctaggt 1200
atcaggagag agtagcaaag cctccctct ctcttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttagagct agagcctgaa aaactccttg 1320
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380
cactcggcct cctatgccag tcccagctc agggtttgg caagggtcaa atgagataat 1440
ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgtt ggaagacagc ctcttctct 1500
tgtaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
gggctcatct tctgcccc aacccagct ctgatttgct tattcagggt gtgtaaatac 1620
ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680
```

acaccatttta atatttccct cacatttcca cccatttctg cactcttttc tgggagttgc 1740  
tgtctcagag ggttggcggg tctgggtggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
gaagcgacgg gttttgagta tttattacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcatgg 1860  
tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgagggt ggtggattgc ttgagctcag 1920  
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980  
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacaa attggcctag cgtgggtgtcg 2040  
tgtgtctgtg gtgcgagtta ctgaggagac caaggtagga ggtaggaaac caaggtagga 2100  
ggatcacccg aggtcgttag ttcgagacca gcctgaccaa catggagaaa ccctgtcttt 2160  
actaaaaata caaaattagc tgggcgtggg ggtgcatgcc tgaattcca gctacttggg 2220  
aggctgagac aggagaatgg ctggaacccg gaaggcggag ttgcggtga gctgagatcg 2280  
cgtcatigca ctccagcctg ggcaacaaga gcaaaactcc gtctcaaaaa aaaagaaata 2340  
tatatatata tgttgtgtgt tgttgtgtgt tgttgtatga tatatatata tgtatgtgta 2400  
tatatatgta tgttgtgtgt tgtgcatata tatatatata ctttgtttta ttgtaagtg 2460  
gtttagttta atttttaata atgtccgtga ttaacagctg gctggcaaga ttcttgagaa 2520  
ctgaagagtt tgccccagcc catccagcac accatgggcc cagggcagac ctgggggcta 2580  
ggcgggtcttg ggttccagag ggctcccatg cccctgtcct attgctcttc tggcaatagg 2640  
acatttacgc gggggggggg ggttcttgat tctgggtcct ttaggggact ctgtgattaa 2700  
gaaacagcag ggatgttgca acagcagggg tgagggtggc ctggggacgg gtcagtgaag 2760  
ggtcttcatt cctagctgct gacctgatct gccctgagat aaaagactaa gaccagaga 2820  
gtgaacgctg tccgcggggg cagaagcgag tgaggcgtcg ggacagtggg gcataaccaa 2880  
gagcaaaacg caaactgaga ctccagcgcc ggtttctcgg gccagccac gcctcctgcc 2940  
tcagctcaat gccactccct ccccgccaag tggctctccg ctctggaggc gggaccgagt 3000  
tctccgggtg cccctggagg ctccggcagc gagctctggg aggcctgggag gggagtgagg 3060  
ggagggggcg tgactgggcc gtccaaagag gagggggcct ttaataggct cgcccagcgc 3120  
ctggcttgct gcgctgcgag tggctgcggt tgcgagaagc cgcccggcac ctccgctag 3180  
ttctcggctg caaatcttcg tccttgcact tgacagcgat tgtacttaag ctccagggc 3240  
gcgctttgct tggaaaggca caggtaggaa gcgcgggctg ccgggtgcac gctcggccc 3300  
ctgggaggag tctccctccc ttggctctcc ttcttgggaa ctgccggctg tccgtagcg 3360  
ttggcgggtc cagagtgcgg gctgcacgga gaccgcggca gcggccggag agcccgggc 3420  
agccccctcc cacagcgagg cgggtgcgctg cccggcgcca tg 3462

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 3455

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

25/27

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt;

&lt;400&gt; 31

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60  
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatit gacctggtcg 120  
ttatcttagg tattaatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180  
gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240  
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgc caacatatcc ctgatacttc 300  
aatccccigg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360  
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420  
atacatgcta atccctttga gcaaattccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480  
tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540  
ccctgccatc ttgactgaca tgcctgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaataaaag 600  
taaagtgcgc ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660  
tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttgggtt tctgcgtttc tctttaatta 720  
taggccccct ttgaacgctc aaacacacag ggcccttgta agcttgaact cctgtctca 780  
cacacagtcc tcccatatcc atacactctc ttcatattgc agagtataaa caccatctc 840  
tcactcattc acataatgaa ttccagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900  
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960  
ggatccctta tggggagaag ataattgggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020  
agccctttct ctcttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080  
attccaaaat tctccacat catccccctt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140  
tgtcctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaaga ttttctaggt 1200  
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctcttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260  
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320  
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380  
cactcggcct cctatgccag tccccagtcc agggtttggc caagggtcaa atgagataat 1440  
ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500  
tgtaactgca gccccagaac ctgacttcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560  
gggctcatct tcttgcccc aaccccagct ctgatttgc tttcagggt gtgtaaatac 1620  
ttctaccagg acctatttca agccattgt atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680  
acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740  
tgtctcagag ggttggcggt tctggtggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800  
gaagcgacgg gttttgagta ttattacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcatgg 1860  
tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgaggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920



26/27

gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaa atacacacac 1980  
acacacacac acacacacac acacacacac acacacaaat tggcctagcg tgggtgctgtg 2040  
tgtctgtggt cgcagttact caggagacca aggtaggagg taggaaacca aggtaggagg 2100  
atcaccgag gtcggtagt ctagaccagc ctgaccaaca tggagaaacc ctgtctttac 2160  
taaaaataca aaattagctg ggcgtggtgg tgcattgcctg taattccagc tacttgggag 2220  
gctgagacag gagaatggct tgaaccggga aggcggagtt tgcgggtgagc tgagatcgcg 2280  
tcattgcact ccagcctggg caacaagagc aaaactccgt ctcaaaaaaa aaaaaatata 2340  
tatatatgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatgtatata tatatatgta tgtgtatata 2400  
tatgtatgtg tgtgtgtgca tatatatata tacactttgt ttaattgtaa gtgtgtttag 2460  
tttaattttt aataatgtcc gtgattaaaca gctggcctggc aagattcctg agaactgaag 2520  
agtttgcccc agcccatcca gcacaccatg ggcccagggc agaccttggg gctaggcggg 2580  
cttgggttcc agagggtcc catgccccgt tcctattgct cttctggcaa taggacattt 2640  
acgcgggggg ggtggttctt gattctgggt cttttagggg actctgtgat taagaaacag 2700  
cagggatgtt gcaacagcag ggatgagggt ggccctggga cgggtcagtg aagggtcttc 2760  
attcctagct cgtgacctga tctgccctga gataaaaagac taagaccag agagtgaacg 2820  
ctgtccgcg gggcagaagc gagtgaggcg tcgggacagt ggggcataac caagagcaaa 2880  
acgcaaaactg agacttcagc gccggtttct cgggccagcc cacgcctcct gcctcagctc 2940  
aatgccactc cctccccgcc aagtggctct cgcctctgga ggccgggaccg agttctccgg 3000  
tggccccctg aggcctccggc agcgagctct gggaggctgg gaggggagtg aggggagggg 3060  
cgctgactgg gccgtccaaa gaggaggggg cctttaatag gctcgcccag cgcctggctt 3120  
gctgcgctgc gagtggctgc ggttgcgaga agccgccgg caccttcgc tagttctcgg 3180  
ctgcaaatct tcttccttgc acttgacagc gattgtactt aagctcccag ggccgccttt 3240  
gcttgaaaag gcacaggtag gaagcgcggg ctgccgggtg cagctcgc gccctgggag 3300  
gagtctccct cccttggctc tcctttctgg gaactgccgg ctgtcccgta gcgttgccgg 3360  
ttccagagtg cgggctgcac ggagaccgcg gcagcgcccg gagagcccgg cccagcccct 3420  
tcccacagcg cggcggtgcg ctgccggcg ccatg 3455

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; Peptide

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 32

Ala Arg Gly ser Val Val Leu thr Ala Lys Cys

1

5

10

27/27

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; Peptide

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 33

Gly Ser Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

10

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 34

agagcggccg cctgctggct cagggtag ctggcgcc

38

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 35

agagcggccg cggaaccatc caccctgtgc ttgttgag

38

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07917

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/GenBank/EMBL/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Flannery CR et al., "Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage," Biochem Biophys Res Commun. Vol. 260 (July 1999) pp.318-22.	1-11
X	Abbaszade I et al., "Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family." J Biol Chem. Vol. 274 (August 1999) pp.23443-50.	1-11
X	Tortorella MD et al., "Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins." Science. Vol. 284 (June 1999) pp.1664-6.	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06 February, 2001 (06.02.01)

Date of mailing of the international search report  
06 March, 2001 (06.03.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/GenBank/EMBL/Geneseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Flannery CR et al. "Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage." Biochem Biophys Res Commun. 第260巻 (1999 Jul) p. 318-22.	1-11
X	Abbaszade I et al. "Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family." J Biol Chem. 第274巻 (1999 Aug) p. 23443-50.	1-11
X	Tortorella MD et al. "Purification and cloning of aggrecanase -1: a member of the ADAMTS family of proteins."	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.02.01

国際調査報告の発送日

06.03.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

印

4B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	Science. 第284巻 (1999 Jun) p. 1664-6.	

